

**Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis
experimentell induzierter kernspezifischer Antikörper
beim Kaninchen**

Saovarose Sanpapisute

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551907_0055

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für
Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. H. Eyer

Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis experimentell
induzierter kernspezifischer Antikörper beim Kaninchen.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Saovarose S a n p a k p i s u t e

aus

Bangkok, Thailand

München

1974



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med.G. Schierz

Mitberichterstatter: Prof. Dr.Dr. H. Eyer

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.3.1975

Inhaltsübersicht

	Seite
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	8
2.1. Immunisierung von Kaninchen	8
2.1.1. Immunisierung mit intakten Thymuskernen aus Kalbsthymus	8
2.1.2. Immunisierung mit desintegrierten Thymus- kernen vom Kalb	8
2.1.3. Immunisierung mit denaturierter DNS aus Kalbsthymus	8
2.2. Herstellung der Antigene zur Kaninchen- immunisierung	10
2.2.1. Gewinnung intakter Thymuskerne	10
2.2.1.1. Isolierung der Kerne	10
2.2.1.2. Material zur Immunisierung sowie für die Agargel-Doppeldiffusion u. Komplementbindung	10
2.2.1.3. Thymuskerne für den Immunofluoreszenztest	12
2.2.2. Gewinnung desintegrierter Thymuskerne	12
2.2.3. Denaturierte DNS zum Antikörpernachweis und zur Immunisierung	13
2.2.3.1. Herstellung von denaturierter DNS	13
2.2.3.1.1. Denaturierte DNS zur Antikörperbestimmung	13
2.2.3.1.2. Herstellung von denaturierter DNS, aggregiert mit methyliertem Rinderserumalbumin zur Kaninchenimmunisierung	14

II

2.3.	Serologische Methoden	14
2.3.1.	Agargel-Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY	14
2.3.2.	Objektträger-Schnelltest mit Latex- Nukleoprotein-Reagens	15
2.3.3.	Indirekter Immunofluoreszenztest (IFT)	15
2.3.3.1.	Immunofluoreszenztest mit Rattenleberschnitten	15
2.3.3.2.	Immunofluoreszenztest mit intakten Thymuskernen	17
2.3.3.	Immunofluoreszenztest mit desintegrierten Thymuskernen	17
2.3.3.4.	Immunofluoreszenztest mit denaturierter Desoxyribonukleinsäure (DNS)	17
2.3.4.	Komplementbindungsreaktion	18
2.3.4.1.	Reagentien der Komplementbindungsreaktion	18
2.3.5.	Absorptionsversuche	19
2.3.5.1.	Absorption der Seren mit intakten Thymuskernen	19
2.3.5.2.	Absorption mit DNS-Bentonit	19
2.3.5.2.1.	Herstellung eines DNS-Bentonit-Reagens	19
2.3.5.2.2.	Absorptionstechnik	20
3	Ergebnisse	21
3.1.	Immunologische Analyse der Seren von Kaninchen, immunisiert mit Thymuskernen bzw. Kernsubstraten	21
3.1.1.	Agargel-Doppeldiffusion	21
3.1.2.	Latex-Nukleoprotein-Test	23
3.1.3.	Indirekter Immunofluoreszenztest	25
3.1.4.	Komplementbindungsreaktion	28
3.1.5.	Absorptionsversuche	30

III

3.2.	Untersuchungen zum Nachweis von Antinuklearfaktoren in Humanseren	32
3.2.1.	Agargel-Doppeldiffusion und Latex-Nukleoprotein-Test	32
3.2.2.	Indirekter Immunofluoreszenztest	32
3.3.	Komplementbindungsreaktion	34
4	Diskussion	37
5	Abbildungen	48
6	Zusammenfassung	49
7	Literaturverzeichnis	51

Verzeichnis der Abkürzungen

ANF	Antinuklearfaktoren
DNS	Desoxyribonukleinsäure
IFT	Immunofluoreszenztest
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
KBR	Komplementbindungsreaktion
LE	Lupus erythematosus
LED	Lupus erythematosus disseminatus
MRSA	Methyliertes Rinderserumalbumin
RSA	Rinderserumalbumin
RNS	Ribonukleinsäure
SLE	Systemischer Lupus erythematosus

Einleitung

Die Bezeichnung Lupus érythémateux wurde 1852 von CAZENAVE und CHAUSIT (14) eingeführt für ein dermatologisches Krankheitsbild, welches vordem unter anderen Namen bekannt war. Weitere Beschreibungen dieser Erkrankung, welche mehr und mehr die Mitbeteiligung anderer Organe bzw. Organsysteme erkennen ließen, wurden veröffentlicht von OSLER (49), LIBMAN und SACKS (41), welche auf das Vorkommen einer Endocarditis hinwiesen, GROSS (22), der das Auftreten von Hämatoxylin-Körperchen bei dieser Form der Endocarditis feststellte, sowie BAEHR u.a. (4), welche die Gefäßbeteiligung charakterisierten.

GROSS (23) konnte 1940 die nahe Verwandtschaft zwischen den lupösen Herzklappenveränderungen und der LIBMAN-SACKS-Endocarditis demonstrieren, bevor KLEMPERER (32) sowie KLEMPERER u.a. (33) mittels cytochemischer Studien und dem Nachweis von Hämatoxylin-Körperchen u.a. in Niere, Milz, Lymphknoten, Serosa und Synovia endgültig die Vielgestaltigkeit des Krankheitsgeschehens aufzeigten, welche die heute üblichen Bezeichnungen Lupus erythematosus disseminatus (LED) oder systemischer Lupus erythematosus (SLE) rechtfertigen.

Nachdem die Diagnosestellung mittels serologischer Untersuchungen wesentlich vereinfacht werden konnte, zeigte es sich, daß der SLE eine keineswegs seltene Krankheit ist. MIESCHER und PARONETTO (46) fanden bei ihrer New Yorker Studie 10 Kranke auf 100 000 Einwohner, wobei die oft lange Krankheitsdauer von durchschnittlich 10 Jahren in Rechnung gestellt werden muß. Das Hauptmanifestationsalter wurde mit dem 3. und 4. Lebensjahrzehnt ermittelt; das weibliche Geschlecht ist etwa 5mal häufiger betroffen als das männliche (DEICHER (15)).

KLEMPERER (32) begründete auch den Begriff der Kollagenkrankheiten oder Kollagenosen, welcher heute nicht mehr zutreffend erscheint, nachdem u.a. auch beim SLE eine Beteiligung der kollagenen Fibrillen am eigentlichen Krankheitsgeschehen ausgeschlossen werden konnte.

Einen für die Ätiologie und Diagnose des SLE sehr bedeutsamen Fortschritt brachte die Entdeckung des LE-Zellphänomens durch HARGRAVES u.a. (25). Die Entstehung der LE-Zellen, polymorphkernigen neutrophilen Leukocyten mit phagocytiertem Kernmaterial in charakteristischer Form und Anordnung, in Abhängigkeit einer zunächst als LE-Faktor bezeichneten Serumkomponente SLE-Kranker (MIESCHER und FAUCONNET (45)) sowie die Erkenntnis, daß es sich bei diesem Faktor um einen kernspezifischen Antikörper handelt (HASERICK u.a. (26)), wies endgültig auf immunologische Prozesse beim SLE hin, zumal in weiteren Untersuchungsreihen der Nachweis antinuklearer Faktoren bei dieser Erkrankung mit großer Regelmäßigkeit gelang. Eine besondere Eigenschaft dieser Antikörper zeigte sich darin, daß sie eine in der Regel zu erwartende Organ- und Speciespezifität vermissen ließen, sich also als rein substratspezifische Antikörper erwiesen.

Insbesondere mittels des indirekten Immunfluoreszenztests und der Komplementbindungsreaktion konnte in der Folgezeit gezeigt werden, daß es neben dem LE-Faktor im engeren Sinne noch weitere kernspezifische Antikörper gibt, welche unter dem Begriff der Antinuklearfaktoren (ANF) zusammengefaßt wurden.

Als korrespondierende Antigene für die ANF wurden eine Reihe von Kernsubstraten identifiziert. Nach der Häufigkeit ihres Auftretens und ihrer Serumkonzentration stehen dabei Antikörper im Vordergrund, welche, wie HOLMAN und KUNKEL (30) demonstrierten, gegen Nukleoprotein,

also den DNS-Histon-Komplex des Kernes gerichtet sind. Ferner ließen sich nachweisen Antikörper gegen die DNS allein (ROBBINS u.a. (55), PEARSON u.a. (51), SELIGMAN und MILGROM (60)), bei denen solche gegen die native bzw. denaturierte Form zu unterscheiden sind (STOLLAR und LEVINE (62)), gegen Histon allein (HOLMAN u.a. (30)), gegen ein lösliches Kernantigen vermutlich ein Glykoprotein (HOLMAN (28)) sowie ein weiteres lösliches Kernsubstrat, welches die Bezeichnung Sm-Antigen erhielt (TAN und KUNKEL (68)).

Die Differenzierung dieser Antikörper gelang vor allem mittels der Komplementbindungsreaktion mit den verschiedenen isolierten Kernsubstraten als Antigen. Daneben ermöglichte der indirekte Immunofluoreszenztest mit Leberschnitten, Leukocyten oder anderen Zellpräparaten unter Umständen eine Differenzierung aufgrund unterschiedlicher Reaktionsbilder. An charakteristischen Reaktionsformen wurden beschrieben:

1. Die homogene Kernfluoreszenz, nach FRIOU (17) bedingt durch DNS-Histon-Komplex-spezifische Antikörper;
2. Die kleinfleckige oder punktförmige ("speckled") Kernfluoreszenz nach BECK (9) sowie LACHMAN und KUNKEL (38) durch Antikörper gegen ein lösliches Kernantigen (Glykoprotein) hervorgerufen;
3. Eine fleckige, auch randständige ("shaggy") Kernfluoreszenz, welche nach CASALS u.a. (13) vorwiegend DNS-spezifischen Antikörpern zuzuschreiben ist und
4. Eine Nucleolusfluoreszenz bei Antikörpern gegen RNS oder RNS-Protein (BECK (1961)).

Diese Grundformen konnten in verschiedenen Kombinationen beobachtet werden, wobei einschränkend festzustellen ist, daß die homogene Kernfluoreszenz andere Reaktionsbilder in der Regel vollständig überdeckt.

Untersuchungen über die Immunglobulinklassenzugehörigkeit der ANF von GOODMAN u.a. (19, 20) sowie BARNETT u.a. (7) ergaben, daß sie vorwiegend in der IgG-Fraktion, mitunter auch bei IgM und IgA zu finden sind. Der zum LE-Zellphänomen führende LE-Faktor erwies sich als 7S-Antikörper.

ANF wurden außer bei SLE mehr oder minder regelmäßig auch bei anderen Erkrankungen wie Periarteriitis nodosa, Sklerodermie, Dermatomyositis, chronischer Polyarthrit, Sjögren-Syndrom, Myasthenia gravis und Hashimoto-Thyreoiditis nachgewiesen (TOWENES u.a. (71), GLYNN und HOLBOROW (8), KURLAND u.a. (36), HERMANN (27) sowie BEICKERT (10), häufig gemeinsam mit anderen Autoimmunantikörpern.

Eine Zuordnung von ANF bestimmter Spezifität zu einer der o.a. Erkrankungen erwies sich generell als nicht möglich, dennoch wurde auf gewisse Zusammenhänge hingewiesen z.B. von FRIOU (17) bezüglich des SLE sowie von BÄUMER (5), der die punktförmige Kernfluoreszenz vor allem mit der Dermatomyositis und Sklerodermie in Zusammenhang brachte.

Die Ätiologie des SLE konnte bislang nicht befriedigend geklärt werden (vergl. u.a. KOFFER und KUNKEL (34), MIESCHER und PARONETTO (46)). Die Regelmäßigkeit des Auftretens von ANF, ihre Fähigkeit zur Reaktion mit Kernen auch normaler Zellen sowie die Demonstration von SELIGMAN (59) und HUMAIR (31), daß vor allem im akuten Stadium der renalen Form komplementbindende Immunprozesse in beträchtlichem Umfang ablaufen, spricht für eine wichtige Rolle immunpathologischer Reaktionen. Für ihre Auslösung wurden mikrobielle Infektionen (McDUFFIE (42)), Strahlungseffekte (LEVINE u.a. (39)) oder auch psychische

Faktoren in Betracht gezogen. Gesichert werden konnte der Zusammenhang zwischen einer allerdings nur vorübergehenden ANF-Bildung und bestimmten Medikamenten wie Hydralazine, Isoniazide, Procainamid u.a. (ALARCON-SEGOVIA u.a. (2) Übersicht bei ALARCON-SEGOVIA (1)).

Feststellungen über das familiär gehäufte Auftreten von ANF bei klinisch Gesunden bzw. Angehörigen Kranker (MORTEO u.a. (47), BURCH und ROWELL (12)) führten zu Überlegungen hinsichtlich einer genetisch bedingten Prädisposition. Letztere (12) wiesen diesbezüglich auf die mögliche Bedeutung dreier Gene des X-Chromosoms hin. Ferner wurden Fragen der immunologischen Toleranz und Möglichkeiten ihrer Durchbrechung in diesem Zusammenhang diskutiert.

Eine pathogenetische Bedeutung wurde vor allem DNS-spezifischen Antikörpern zugeschrieben. TAN u.a. (70) sowie SCHUR und SANDSON (56) berichteten über das Auftreten freier DNS bei renalen Formen des SLE, ferner konnten korrespondierende Antikörper in Form eines komplementbindenden Immunkomplexes im Bereich renaler Läsionen nachgewiesen werden (FREEDMAN und MARKOWITZ (16), KOFFLER u.a. (35), SVEC u.a. (66)). Auch in Hautläsionen des SLE wurde die Bindung von ANF an Zellkerne demonstriert (TAN und KUNKEL (68)).

Das spontane Auftreten einer lupusähnlichen Nephritis wurde bei NZB/NZW F₁-Hybriden von SEEGAL u.a. (57) beschrieben. Bei dieser rasch zum Tode führenden Erkrankung fanden sich im Nierengewebe der Mäuse ebenfalls Komplexe von denaturierter DNS und Antikörpern entsprechender Spezifität, denen höchstwahrscheinlich eine entscheidende pathogenetische Rolle zufällt. Kernspezifische Antikörper wurden ferner festgestellt bei einem spontan erkrankten Hund mit therapie-

resistenten Veränderungen im Sinne einer rheumatoiden Arthritis, Anämie und Leukopenie (LEWIS und HATHAWAY (40)).

Die experimentelle Auslösung eines SLE beim Tier durch Injektion von Kernmaterial gelang demgegenüber bisher nicht, wie seinerzeit bereits MIESCHER u.a. (44) anhand histologischer Studien feststellten, obwohl auf diesem Wege die Bildung kernspezifischer Antikörper induziert werden konnte (PHILLIPS u.a. (52), GOODMAN (19)). Zellkerne und isoliertes Nukleoprotein waren dazu gleichermaßen geeignet (MIESCHER u.a. (44)). Die seither durchgeführten relativ zahlreichen Untersuchungen (s. auch Abschnitt Diskussion) befaßten sich vorwiegend mit DNS-spezifischen Antikörpern. DNS allein erwies sich als Hapten, welches zur Immunisierung der Bindung an ein Trägerprotein bedarf. In dieser Beziehung bewährte sich insbesondere der Komplex mit methyliertem Rinderserumalbumin wie von PLESCIA u.a. (53) beschrieben.

In der vorliegenden Studie wurden hauptsächlich zwei Ziele verfolgt:

1. Der Vergleich der Immunantwort nach der Immunisierung von Kaninchen mit isolierten intakten bzw. mechanisch aufgeschlossenen desintegrierten Kalbsthymuskernen. Hierbei interessierte insbesondere die Frage, ob durch die Ruptur der Kernstruktur zusätzliche Antigene bzw. Antigendeterminanten freigesetzt werden können. Auf eine Immunisierung mit isolierten Kernsubstraten wurde im Hinblick auf mögliche chemisch-strukturelle Veränderungen bei der Isolierung verzichtet. Lediglich DNS wurde zu Vergleichszwecken in reiner Form verwendet.
2. Die tierexperimentell gewonnenen Antiseren sollten nicht nur hinsichtlich ihrer Reaktionsfähigkeit mit verschiedenen kernspezifischen

Antigenen bzw. Antigenpräparaten, sondern auch mit verschiedenen serologischen Verfahren untersucht werden, um festzustellen, welche dieser Verfahren zu einer ausreichenden immunologischen Charakterisierung der Seren zweckmäßig bzw. erforderlich sind und welche Unterschiede sich zwischen ihnen und Seren von SLE-Patienten im einzelnen nachweisen lassen.

II Material und Methoden

2.1. Immunisierung von Kaninchen.

Insgesamt wurden 12 Kaninchen von 3-4 kg Körpergewicht Immunisierungsversuchen unterzogen. Nach Entnahme einer Blutprobe (Nullwert) vor Beginn des Versuchs wurden je 4 Kaninchen mit Suspensionen intakter Thymuskern, desintegrierter Thymuskern bzw. mit denaturierter Desoxyribunucleinsäure immunisiert (siehe Tab. 2).

2.1.1. Immunisierung mit intakten Thymuskernen aus Kalbsthymus.

Die Antigensuspension (200 mg/ml isolierte Kerne in Aqua dest) entsprechend den Angaben von MIESCHER u.a. (1961) (44) hergestellt, wurde 3 Wochen lang subcutan 3 mal wöchentlich injiziert, beginnend mit 2 Dosen von 0,5 ml, dann 1,0 ml. Das 1 Woche nach der letzten Injektion entnommene Blut zeigte im Immunofluoreszenztest in der Regel keine ausreichenden Antikörperkonzentrationen, so daß ein zweiter dreiwöchiger Immunisierungszyklus mit 2 Injektionen pro Woche erforderlich war. Für die erste Injektion dienten 0,5 ml, für alle folgenden 1,0 ml der Antigensuspension.

2.1.2. Immunisierung mit desintegrierten Thymuskernen vom Kalb.

Die Antigensuspension (30 mg/ml Kernmaterial in physiologischer Kochsalzlösung, adsorbiert an $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$, Herstellung siehe unten) wurde nach dem o.a. Schema in 2 Zyklen zu je 3 Wochen (s.o.) injiziert. Die Blutentnahme erfolgte ebenfalls den obigen Angaben entsprechend.

2.1.3. Immunisierung mit denaturierter DNS aus Kalbsthymus.

Das Antigen, mit methyliertem Rinderserumalbumin (RSA) aggregierte DNS in Emulsion mit komplettem FREUND'schen Adjuvans (Endkonzentration 0,25 mg/ml), Herstellung nach den Angaben von PLESCIA u.a. (53), wurde 3 Wochen lang einmal wöchentlich injiziert, wobei die Antigengabe gleichzeitig mit 0,4 ml in die Fußballen und mit 1 ml intramuskulär

Tabelle 1: Bezeichnung der immunisierten Kaninchen.

Gruppe	Immunisierung mit	Kaninchen-Bezeichnung
1	ganzen Thymuskernen	K 25, K 26, K 1, K 2
2	desintegrierten Thymuskernen	K 27, K 28, K 3, K 4
3	denaturierter DNS	K A, K B, K C, K E

Tabelle 2: Immunisierungsprogramm der Kaninchen.

Zeit	Immunisierung mit		denaturierte DNS (0,25 mg/ml)
	ganze Thymuskern (200 mg/ml)	desintegrierte Thymuskern (30 mg/ml+NH ₄ Al(SO ₄) ₂)	
1. Woche	2 x 0,5 ml 1 x 1,0 ml	2 x 0,5 ml 1 x 1,0 ml	1 x 0,4 ml in Fußballen + 1,0 ml i.m.
2. Woche	3 x 1,0 ml	3 x 1,0 ml	1 x 0,4 ml in Fußballen + 1,0 ml i.m.
3. Woche	3 x 1,0 ml	3 x 1,0 ml	1 x 0,4 ml in Fußballen + 1,0 ml i.m.
Blutentnahme zur Kontrolle			
4. Woche	1 x 0,5 ml 1 x 1,0 ml	1 x 0,5 ml 1 x 1,0 ml	Entblutung
5. Woche	2 x 1,0 ml	2 x 1,0 ml	
6. Woche	2 x 1,0 ml	2 x 1,0 ml	
7. Woche	Entblutung	Entblutung	

erfolgte. Keines der Tiere zeigte während der Immunisierung irgendwelche äußerlich wahrnehmbaren Veränderungen. Die Entblutung erfolgte 1 Woche nach der letzten Antigeninjektion. Das Blut wurde kurz gerührt und anschließend bis zur Absetzung der Erythrocyten im Kühlschrank belassen. Der Überstand wurde 15 min bei 1800 UpM (Ecco-Superior-II-B) zentrifugiert, das Serum zu je 5 ml abgefüllt und bei -20°C eingefroren und aufbewahrt.

2.2. Herstellung der Antigene zur Kaninchenimmunisierung.

2.2.1. Gewinnung intakter Thymuskern.

2.2.1.1. Isolierung der Kerne (3, 24,61).

Die frisch gewonnene Thymusdrüse wird im Eisbad vom umgebenden Gewebe befreit, in einer hypotonen Lösung, die 0, 225 M Saccharose und 0,0033 M CaCl_2 enthält, gewaschen und mit der Schere zerkleinert. Je 50 g werden zunächst manuell mit 450 ml der o.a. Saccharose- CaCl_2 -Lösung geschüttelt und dann 4 min bei 7 000 UpM zentrifugiert. Anschließend wird das grob zerkleinerte Gewebe durch ein Nesseltuch filtriert, im Potter-Elvehjem-Homogenisator bei 200 UpM homogenisiert und danach 15 min bei 1800 UpM zentrifugiert. Zur Entfernung noch verbleibender unerwünschter Zellbestandteile muß das Sediment mehrmals mit hypotoner Saccharose- CaCl_2 -Lösung gewaschen und erneut homogenisiert sowie zentrifugiert werden (mikroskopische Kontrolle nach Hämalaun-Eosin-Färbung). Das auf diese Weise erhaltene Kernpräparat der Thymusdrüse wurde unterschiedlich weiterverarbeitet.

2.2.1.2. Material zur Immunisierung sowie für die Agargel-Doppeldiffusion und Komplementbindungsreaktion.

Zur Immunisierung der Kaninchen wurde das Sediment in etwas destilliertem Wasser aufgenommen, lyophilisiert und anschließend in einer Konzentration von 200 mg/ml in sterilem dest. Wasser suspendiert.

Thymusdrüse vom Kalb

Präparieren, Fett und Kapsel entfernen
Waschen mit hypotoner Saccharose- CaCl_2 -Lösung
Zerkleinern
Schütteln, manuell
Homogenisieren 4 min bei 7 000 UpM (Homogenisator
Fa.E.Bühler)
Filtrieren durch Nesseltuch
Potterisieren
Zentrifugieren 15 min bei 1 800 UpM } wiederholen
Waschen des Sediments

intakte Thymuskerne

Lyophilisieren

Immunisierungsantigen

Antigen für:

- Ouchterlonytest

- Komplementbindungs-
reaktion

- Serenabsorption

Ficoll + Thymuskerne

3 Teile 4 Teile

5 min zentrifugieren bei 180 g

Sediment in H_2O dest.

reine Thymuskerne

Antigen für Immunofluoreszenz

Desintegrieren mit

Quarzsand 15 min

Überstand lyophilisieren

desintegrierte
Thymuskerne

Immunisierungsantigen

Antigen für:

- Ouchterlonytest

- Immunofluoreszenztest

- Komplementbindungsreakt.

Tabelle 3: Verarbeitung der Thymusdrüse.

Zur Antikörperbestimmung im Ouchterlonytest (50) und in der Komplementbindungsreaktion werden ebenfalls nach dieser Methode gewonnene lyophilisierte Thymuskern e als Antigene verwendet in Konzentrationen von 5 mg/ml dest. Wasser bzw. 0,2 mg/ml veronalgepufferte Salzlösung.

2.2.1.3. Thymuskern e für den Immunofluoreszenztest.

Zur Gewinnung intakter Thymuskern e als Antigen für den Immunofluoreszenztest wurde das Präparat durch Zentrifugieren mit Ficoll nach der Methode von ALLFREY u.a. (3) weiter gereinigt. Dazu muß Ficoll (Pharmacia, Uppsala), eine synthetische Polysaccharose, zunächst von kern-toxischen Bestandteilen befreit werden durch eine 2-3-tägige Dialyse gegen destilliertes Wasser (ca 5 l H₂O/100 g Ficoll, 3-stündiger Wechsel des Wassers, auf Magnetrührer im Kühlraum). Von dem anschließend lyophilisierten Material werden zur Herstellung der Ficoll-Stammlösung 100 g in 100 ml der hypotonen Saccharose-CaCl₂-Lösung (s.o.) suspendiert. 20 ml dieser Stammlösung unter Rühren mit 55 ml der hypotonen Saccharose-CaCl₂-Lösung vermischt, ergeben die Gebrauchslösung, von der in einem Zentrifugenglas 3 Teile mit 4 Teilen der Thymuskern suspension vorsichtig überschichtet und 5 min bei 180 g zentrifugiert wurden. Nach Verwerfen des klaren Überstandes und der Ficollschicht, die nicht sedimentierte Kern e enthält, wurde das Sediment, welches aus reinen Kern en besteht, in dest. Wasser aufgenommen, lyophilisiert und in einer Konzentration von 0,125 mg/ml H₂O als Antigen für den Immunofluoreszenztest gebraucht.

2.2.2. Gewinnung desintegrierter Thymuskern e.

Zur Gewinnung desintegrierter Thymuskern e wurde die Kalbsthymusdrüse wie oben beschrieben präpariert und homogenisiert. Das so erhaltene Sediment wurde im Verhältnis 1:10 bis 1:20 mit Quarzsand versetzt, mit etwas destilliertem Wasser zu einem dicken Brei verrührt und in der

Vibrogen-Zellmühle (Typ Vi 2, Bachhofer, Reutlingen) 15 min bearbeitet. Zur Absenkung des Quarzsandes wurde das Homogenisat in einem Reagenzglas für 30 min stehen gelassen, anschließend wurde der Überstand, der die desintegrierten Thymuskerne enthält, lyophilisiert.

Zur Herstellung der Antigenlösung für die Kaninchenimmunisierung wurden 1,4 g des lyophilisierten Materials mit 42 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Zu je 10 ml der so gewonnenen Lösung wurden 1 ml 1% $\text{NH}_4\text{Al}(\text{SO}_4)_2$ gegeben und mit 1 N NaOH unter Flockenbildung auf pH 7,0 eingestellt. Die Antigenlösung enthielt somit 30 mg desintegrierte Thymuskerne pro ml und war ausreichend zur Immunisierung von 2 Kaninchen.

Zur Antikörperbestimmung wurden die desintegrierten und lyophilisierten Thymuskerne in folgenden Konzentrationen verwendet: im Ouchterlony-Test 5 mg/ml H_2O , im Immunofluoreszenztest 0,125 mg/ml H_2O , in der Komplementbindungsreaktion 0,2 mg/ml veronalgepufferte Salzlösung.

2.2.3. Denaturierte DNS zum Antikörpernachweis und zur Immunisierung.

2.2.3.1. Herstellung denaturierter Desoxyribonukleinsäure (DNS).

Als Ausgangsmaterial diente Desoxyribonukleinsäure aus Kälberthymus, lyophilisiert, reinst, hochpolymer der Firma Serva, Heidelberg. Davon wurden 4 mg nach den Angaben von TAN und NATALI (69) in 8 ml 0,15 M Kochsalzlösung (= 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gelöst, 10 min im Wasserbad bei 100 °C gekocht und sofort im Eisbad abgekühlt. Das denaturierte Präparat wurde zum Gebrauch jeweils frisch hergestellt.

2.2.3.1.1. Denaturierte DNS zur Antikörperbestimmung.

Herstellung und Konzentration der DNS-Lösung für den Ouchterlony-Test werden unter 2.3.1., für den Immunofluoreszenztest unter 2.3.3.3., für die Komplementbindungsreaktion unter 2.3.4. beschrieben.

2.2.3.1.2. Herstellung von denaturierter DNS, aggregiert mit methyliertem Rinderserumalbumin (MRSA) zur Kaninchenimmunisierung.

Nach den Angaben von PLESCIA u.a. (53) wurden 10 mg MRSA in 1 ml Wasser gelöst; 0,2 ml dieser Lösung mit 4 ml einer frisch denaturierten DNS-Lösung gemischt und bei Zimmertemperatur gerührt. Anschließend wurde die Mischung tropfenweise zu 4,2 ml komplettem FREUND'schem Adjuvans gegeben und gründlich emulgiert. Die Injektion erfolgte in einer Endkonzentration von 0,25 mg DNS/ ml.

Zur Herstellung von methyliertem RSA wurde 1 g Rinderserumalbumin (RSA) in 100 ml absolutem Methanol suspendiert und mit 0,85 ml 12 N HCL versetzt. Die Suspension blieb bei gelegentlichem Umrühren 3 Tage im Dunkeln stehen. Danach wurde das Gemisch zentrifugiert und das Sediment 2-mal in Methanol und 2-mal in wasserfreiem Äther gewaschen. Nach Abdampfen des Äthers erfolgte die Trocknung im Vakuum über KOH bis zur Pulverform. Das Präparat wurde über KOH aufbewahrt (53).

2.3. Serologische Methoden.

2.3.1. Agargel-Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY (50).

Die Methode der Geldiffusion wurde nach OUCHTERLONY (50) auf dem Objektträger durchgeführt. Zur Herstellung der Gele diente 1% Agar (Noble, Difco) in 0,85% gepufferter Kochsalzlösung pH 7,2. Als Bacteriostaticum wurde Merthiolat (100 µg/ml) zugegeben. Die Gelschicht betrug 2-3 mm (2 ml Gel pro Objektträger). Zur besseren Haftung wurden die Objektträger vorbereitend mit einer dünnen Gelschicht bestrichen, die bei 80°C aufgetrocknet wurde. Es wurden verschiedene Testanordnungen verwendet, wobei die Durchmesser der Löcher 4-9 mm, der Abstand zwischen Antigen- und Antikörperreservoir zwischen 5 und 7 mm betrug. Die Löcher wurden je nach Größe mit etwa 0,1 - 0,2 ml Antigen bzw. Serum gefüllt.

An Antigenen wurden getestet:

1. Intakte Thymuskern (siehe 2.2.1.) in destilliertem Wasser, in der Regel 5 mg/ml.
2. Desintegriertes Kernmaterial (siehe 2.2.2.) unter den o.a. Bedingungen.
3. Denaturierte DNS (siehe 2.2.3.1.) in 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,0 in verschiedenen Konzentrationen zwischen 1 mg/ml und 0,005 mg/ml.

Die Kaninchenserum wurden unverdünnt eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei Zimmertemperatur (ca 20°C) über 4 Tage in einer feuchten Kammer. Nach einer ersten Ablesung der Präcipitationslinien wurden die Objektträger zum Auswaschen des überschüssigen Proteins mit 0,85% Kochsalzlösung (2 Tage lang auf Magnetrührer, 5-maliger Wechsel der Lösung pro Tag), behandelt, getrocknet und die Linien mit Ponceaurotlösung (21) gefärbt.

Für die Agardiffusion mit denaturierter DNS wurde anstelle von Agar Agarose in einer Konzentration von 0,6% in einem Gemisch von 1 Teil 0,85% NaCl und 7% Glycin, sowie 1 Teil Phosphatpuffer pH 7,2 nach den Angaben von TAN und KUNKEL (67) verwendet.

2.3.2. Objektträger-Schnelltest mit Latex-Nukleoprotein-Reagens.(65)

Zur Durchführung des Tests diente das LE-Latex-Nukleoprotein-Reagens der Firma Hyland (Calif. U.S.A.) von dem je 1 Tropfen mit 1 Tropfen Kaninchenserum zusammengegeben (genaue Applikation mit Kapillarpipette) und auf einer Fläche von 20 x 40 mm ausgebreitet wurde. Die Ablesung nach 1 min erfolgte gegen einen dunklen Untergrund. Als positiver Befund wurde lediglich eine makroskopisch eindeutig wahrnehmbare Agglutination gewertet. Bei jedem Test wurden Negativ- und Positivkontrollen mitgeführt.

2.3.3. Indirekter Immunofluoreszenztest (IFT).

2.3.3.1. IFT mit Rattenleberschnitten.

Der indirekte IFT wurde nach den Angaben von NAIRN (48) durchgeführt.

Die Objektträger wurden mit 0.5% Gelatinlösung bestrichen, getrocknet

für 20 min in 10% Formalinlösung gehärtet und mit destilliertem Wasser abgespült. Zur Gewinnung der Rattenleberschnitte wurde die Leber sofort nach der Entnahme in passende Stücke geschnitten und in physiologischer Kochsalzlösung mit einem Zusatz von 0,5% Phenol aufbewahrt (+4°C). Am folgenden Tag wurden die Leberstückchen in Kohlensäureschnee rasch eingefroren und mit dem Gefriermikrotom nach Pearse (Typ HS, South London Electrical Equipment, London) geschnitten. Schnitte von 7µ Dicke wurden auf den präparierten Objektträger aufgezogen und durch 2-stündiges Trocknen vor dem Ventilator bei Zimmertemperatur fixiert.

Die Seren wurden unverdünnt bzw. in einer mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung pH 7,4 hergestellten Verdünnungsreihe (1:2, 1:4 usw.) untersucht. Die Inkubation von Schnitt und Serum erfolgte bei Zimmertemperatur für 30 min in einer gut schließenden feuchten Kammer. Anschließend wurden die Objektträger 3 mal in phosphatgepufferter Kochsalzlösung pH 7,4 gewaschen, vorsichtig abgetrocknet, mit einem Tropfen fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Anti-Ig-Globulin-Konjugat (s.u.) beschickt und wiederum 30 min in der feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem 3-maligen Waschen und vorsichtigem Abtrocknen wurden die Schnitte mit einem Tropfen gepufferten Glycerin pH 7,2 beschickt und mit einem Deckglas abgedeckt.

Als fluoreszenzfarbstoffgekoppelte Anti-Ig-Globulin-Konjugate kamen zur Anwendung:

1. Zum Antikörpernachweis in Kaninchenserum ein Anti-Kaninchen-IgG-FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-Konjugat, hergestellt aus der IgG-Fraktion von Schweine-Immunglobulin, der Firma Dakopatts (Dänemark) in der Verdünnung 1:5 (Rattenleberschnitte) bzw. 1:10 (Thymuskern).
2. Zum Antikörpernachweis in Humanserum (Thymuskern) ein Anti-Human-IgG-FITC-Konjugat, hergestellt aus der IgG-Fraktion von Kaninchenimmunsereum (292/3, im Institut hergestellt und routinemäßig verwendet).

3. Zum Antikörpernachweis in Humanseren (Leberschnitte) ein Antihuman-IgG-Lissamin-Rhodamin-RB200-Konjugat, hergestellt aus der IgG-Fraktion von Kaninchen-Immunserum (286/2, im Institut hergestellt und routinemäßig verwendet).

Die Auswertung der Fluoreszenztest erfolgte mit dem Leitz-Ortholux-Mikroskop bei Auflichtbeleuchtung mit dem Opak-Illuminator; Lampe: Quecksilberhöchstdruckbrenner HBO 200W. Erregerfilter für FITC: BG 3, BG 38, Sperrfilter K510. Erregerfilter für RB 200: BG 38, KP 560; Sperrfilter K570.

2.3.3.2. IFT mit intakten Thymuskernen.

Die Objektträger wurden mit einem Spiritus-Aceton-Gemisch (2+1) gereinigt und von der Unterseite mit einem Diamantschreiber ringförmig markiert. Auf diese markierten Stellen wurde mit der Injektionsnadel je ein Tropfen der Thymuskernsuspension (0,125 mg reine Thymuskerne/ml H_2O) gegeben und bei Zimmertemperatur der Trocknung überlassen. Zum Anschwellen der Kerne wurden die Objektträger 10 min in 95% reinem Alkohol fixiert und sofort vor dem Ventilator getrocknet. Die Durchführung des Tests erfolgte wie unter 2.3.3.1. angegeben. Wie Vorversuche zeigten, war in diesem Falle eine Verdünnung des Anti-Kaninchen-IgG-FITC-Konjugats im Verhältnis 1:10 mit gepufferter Kochsalzlösung pH 7,4 erforderlich.

2.3.3.3. IFT mit desintegrierten Thymuskernen.

Der IFT mit desintegrierten Thymuskernen (0,125 mg desintegrierte Thymuskerne/ml H_2O) wurde wie unter 2.3.3.2. beschrieben durchgeführt.

2.3.3.4. IFT mit denaturierter DNS.

Der IFT mit denaturierter DNS erfolgte nach den Angaben von TAN und NATALI (69). Auf die mit Spiritus-Aceton gereinigten Objektträger wurden je 2 μ l einer frisch denaturierten DNS-Lösung (s. 2.2.3.1.)

in einer Konzentration von 0,1 mg/ml aufgetropft. Nach Lufttrocknung vor dem Ventilator für 2 Std wurden die Präparate 10 min in Aceton fixiert und erneut vor dem Ventilator getrocknet. Die Durchführung des Tests erfolgte wie unter 2.3.3.1. beschrieben.

2.3.4. Komplementbindungsreaktion.

2.3.4.1. Reagenzien der Komplementbindungsreaktion.

Veronalgepufferte Stammlösung: 83,0 g NaCl

10,19 g 5,5 Diäthylbarbitursäure, Na-Salz

1,0 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

0,22 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

39,0 ml 1N HCL

ad 2000 ml Aqua dest.

Zum Gebrauch wurde 1 Teil der Stammlösung mit 4 Teilen dest. Wasser verdünnt.

Antigene:

Suspension intakter Thymuskerne 0,2 mg/ml in Veronalpuffer.

Suspension desintegrierter Thymuskerne 0,2 mg/ml in Veronalpuffer.

Native DNS-Lösung 10 µg/ml in Veronalpuffer.

Frisch denaturierte DNS-Lösung 10 µg/ml in Veronalpuffer.

Seren:

Humanseren wurden für 30 min im Wasserbad bei 56°C inaktiviert und in einer Verdünnungsreihe beginnend mit 1:5 untersucht. Bei den Kaninchenseren waren zusätzliche Maßnahmen zur Herabsetzung ihrer anti-komplementären Eigenschaften erforderlich. Sie wurden 30 min bei 56°C inaktiviert. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe mit Veronalpuffer angelegt, der einen Zusatz von 50 µg/ml RSA enthielt und 1 std bei Zimmertemperatur inkubiert.

Komplement:

Als Komplementquelle diente konserviertes Meerschweinchenserum

(Behringwerke) Die für den Hauptversuch benötigte Komplementdosis (2 lösende Einheiten) wurde nach der KOLMER-Technik (36) in einem Vorversuch mit verschiedenen Mengen der Komplementserumvorverdünnung 1:30 ermittelt.

Hämolytisches System:

Frisch gewonnenes defibriniertes Hammelblut wurde serumfrei gewaschen, in 2% Suspension zu gleichen Teilen mit einem 1:1000 verdünnten Ambozeptorserum (Ambozeptor 1:4000, Behringwerke) vermischt und 30 min im Brutschrank bei 37°C sensibilisiert.

Der Hauptversuch wurde nach der von KOLMER (36) angegebenen Makrotechnik im Röhrchen durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 15-18 std bei 4°C, anschließend für 15 min bei 37°C sowie nach Zugabe des hämolytischen Systems bei 37°C bis zur Lysis in den Antigen- und Serumkontrollröhrchen (gewöhnlich ca 10 min).

2.3.5. Absorptionsversuche.

2.3.5.1. Absorption der Seren mit intakten Thymuskernen.

Je 1 ml der Seren wurden mit 50 mg (Kaninchenimmunsere) bzw. 200 mg (ANF-positive Humansere) lyophilisierten intakten Thymuskernen 60 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Seren 10 min bei 1500 UpM zentrifugiert und dekantiert.

2.3.5.2. Absorption mit DNS-Bentonit.

2.3.5.2.1. Herstellung eines DNS-Bentonit-Reagens.

Nach den Angaben von BERTRAMS (11) wurden 0,5 g Bentonit ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 4 \text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) in 100 ml H_2O suspendiert und 1-2 min bei 24 000 UpM im Ultra-Turrax (Janke und Kunkel, Staufen) homogenisiert. Anschließend wurde die mit H_2O auf 500 ml aufgefüllte Suspension für 20 min bei 1500 UpM zentrifugiert und das in 40 ml H_2O aufgenommene Sediment erneut bei 24 000 UpM homogenisiert. Zur Gewinnung einer Stammlösung

wurde die Suspension mit Wasser auf eine optische Dichte von 1,3 bei 546 nm eingestellt. Die Lösung war bei +4°C 1-2 Monate haltbar.

Zur Sensibilisierung der Bentonitpartikel wurden je 5 ml der Stammlösung mit 2 mg nativer bzw. denaturierter DNS, gelöst in 5 ml H₂O, im Cenco-Mixer kurz gemischt. Nach Zugabe von 0,5 ml gesättigter KCl-Lösung wurde das Gemisch für 60 min bei Zimmertemperatur unter gelegentlichem Schütteln aufbewahrt. Danach wurden 0,5 ml einer frischen 1% Rinderserumalbumin-Lösung und 10 min später 0,5 ml einer 0,1% Methylenblaulösung zugesetzt. Das nach Zentrifugieren bei 1500 UpM für 15 min gewonnene Sediment wurde auf dem Cenco-Mixer tropfenweise mit H₂O auf 10 ml aufgefüllt. Nach erneutem Waschen und Sedimentieren wurde das Material schließlich in 2,5 ml H₂O resuspendiert.

2.3.5.2.2. Absorption der Seren.

1,0 ml des o.a. DNS-Bentonit-Reagens wurde 10 min bei 1500 UpM zentrifugiert, das Sediment mit 0,5 ml Serum vermischt, 45 min bei 37°C inkubiert, 10 min bei 3 000 UpM zentrifugiert und das Serum dekantiert. Die absorbierten Kaninchenimmunsere (K 25, K 27, K B) wurden im IFT gegen Rattenleberschnitte, intakte Thymuskerne und denaturierte DNS getestet. Die absorbierten Humanseren gegen Meer-schweinchenleberschnitte und intakte Thymuskerne.

III Ergebnisse

3.1. Immunologische Analyse der Seren von Kaninchen, immunisiert mit Thymuskernen bzw. Kernsubstraten.

3.1.1. Agargel-Doppeldiffusion.

Der Ouchterlony-Test erschien als relativ wenig empfindliches Testsystem zunächst besonders geeignet, die Frage nach einer quantitativ ausreichenden Immunantwort der Versuchstiere zu beantworten. Aus einer Reihe orientierender Versuche ergab sich die Notwendigkeit, relativ große Mengen an Antigen und Antiserum (Durchmesser der Reservoire 9mm) über mehrere Tage - in der Regel 4 Tage - reagieren zu lassen bis zur optimalen Präzipitatbildung (vergl. auch TAN u.a. (69)). Alle positiven Reaktionen zeigten jeweils nur eine Präzipitatinie (s. Abb.1), die zur Kontrolle mitgeführten Kaninchen-Normalseren ließen keinerlei Ausfällungen erkennen.

Die Ergebnisse aller Kaninchen-Immunseren gegenüber intakten Thymuskernen, desintegriertem Kernmaterial sowie frisch denaturierter DNS - für letztere wurde zur Verbesserung der Diffusionsverhältnisse Agarose anstelle von Agar verwendet - sind in Tab.4 zusammengefaßt. Dabei fällt auf, daß mit intakten und desintegrierten Kernen in allen Fällen übereinstimmende Ergebnisse bei den einzelnen Seren zu verzeichnen waren. Unterschiede zwischen den beiden Testantigenen sind somit nicht nachweisbar. Ebenso wenig finden sich Anhaltspunkte für eine unterschiedliche Spezifität der Kaninchenserum in den Gruppen 1 und 2, welche gegen die beiden Kernantigene Identitätsreaktionen zeigten. Daß aus der Gruppe 1 drei der vier Seren eine positive Reaktion aufwiesen, aus Gruppe 2 dagegen nur einer, muß demnach auf quantitative Unterschiede in der Bildung präzipitierender Antikörper zurückgeführt werden.

Kaninchen-Immunseren	Antigene		
	intakte Thymuskern	desintegrierte Thymuskern	denaturierte DNS
Gruppe 1	K 25	P +	P -
	K 26	P +	P -
	K 1	P -	P -
	K 2	P +	P -
Gruppe 2	K 27	P +	P -
	K 28	P -	P -
	K 3	P -	P -
	K 4	P -	P -
Gruppe 3	K A	P +	P -
	K B	P +	P -
	K C	P -	P -
	K E	P +	P -
Kaninchen-Normalserum	P -	P -	P -

Tabelle 4 : Ergebnisse des Ouchterlony-Tests.

P + = Präzipitation

P - = keine Präzipitation.

Intakte Kerne erscheinen zur Immunisierung günstiger als desintegrierte.

Besonders zu vermerken ist die unerwartete Feststellung, daß die Seren aus der Gruppe 3 - immunisiert mit denaturierter DNS im Komplex mit methyliertem BSA - mit denaturierter DNS nicht präzipitierten, obwohl 3 von ihnen mit den beiden anderen Antigenen deutliche, für einen nicht unerheblichen Antikörpergehalt sprechende Präzipitate lieferten. Diese mangelnde Reaktionsfähigkeit der Seren mit dem homologen Hapten hat wahrscheinlich keine immunologische sondern eine technische Ursache in der erheblichen Viscosität der DNS nach Denaturierung, welche einer guten Diffusion in das Agarosegel entgegensteht.

Eindeutig ist dagegen, daß intakte bzw. desintegrierte Kerne nicht nur mit DNS-Nukleoprotein-spezifischen, sondern auch mit isoliert DNS-spezifischen Antikörpern im Sinne einer Präzipitation zu reagieren vermögen.

3.1.2. Latex-Nukleoprotein-Test.

Die passive Latexagglutination stellt im Vergleich zur Agargel-Doppeldiffusion ein wesentlich empfindlicheres Testsystem dar, welches jedoch - wie die Erfahrungen beim Nachweis kernspezifischer Antikörper in Humanseren demonstrieren - in diesem Falle nicht voll zum Tragen kommt. Die Ursache ist in erster Linie in Schwierigkeiten bei der Präparation von Nukleoprotein bzw. dessen Fixierung auf Latexpartikeln zu suchen.

Wie Tab. 5 ausweist, ergaben von den 12 Kaninchenimmunsereen nur 4 eine positive Reaktion, davon 3 aus Gruppe 3 und eines (K 27) aus Gruppe 2. Ein Vergleich mit den Ergebnissen des Ouchterlony-Tests deutet an, daß die Befunde mit der begrenzten Reaktionsfähigkeit des Latex-DNS-Protein-Reagens erklärt werden müssen: Lediglich die antikörperreichsten Seren vermögen eine Verklumpung herbeizuführen. Eine

Kaninchen-Immunseren		Latex-Antigenpartikel mit Desoxyribonukleoprotein
Gruppe 1	K 25	A -
	K 26	A -
	K 1	A -
	K 2	A -
Gruppe 2	K 27	A +
	K 28	A -
	K 3	A -
	K 4	A -
Gruppe 3	K A	A ++
	K B	A ++
	K C	A -
	K E	A ++
Kaninchen-Normalserum		A -

Tabelle 5 : Ergebnisse der Antikörperbestimmung an
Kaninchen-Immunseren im Latex-Nukleoprotein-Test.
A + = Agglutination
A - = keine Agglutination.

Beurteilung der Immunseren hinsichtlich der Spezifität ihrer Antikörper erscheint dagegen mit diesem Test nicht möglich. Immerhin zeigt sich auch hier wie bei der Geldiffusion, daß ausschließlich DNS-spezifische Antikörper über das DNS-Nukleoprotein erfaßt werden können.

3.1.3. Indirekter Immunofluoreszenztest

Der IFT hat sich hinsichtlich seiner Sensitivität sowie der Möglichkeit einer Differenzierung von Antikörpern gegen verschiedenartige Kernsubstrate für die Beurteilung von Humanseren besonders bewährt. Er dürfte somit auch für die Charakterisierung der Kaninchenimmunseren als erfolgversprechende Methode angesehen werden. Als Antigene wurden neben Thymuskernen in ganzer bzw. desintegrierter Form sowie denaturierter DNS auch Ratten- oder Meerschweinchenleberschnitte, die sich in ihrem Reaktionsvermögen nicht unterscheiden, eingesetzt, wie sie zur Untersuchung von Humanseren Anwendung finden. Die Ergebnisse sind in Tab.6 zusammengefaßt.

Betrachtet man zunächst die Seren der Gruppe 1 und 2 in ihrer Reaktion mit intakten oder desintegrierten Kernen (vergl. auch Abb.3) so fällt wiederum die Einheitlichkeit der Ergebnisse auf. Es entsteht der Eindruck, daß hinsichtlich Ausmaß und Spezifität der Antikörperbildung in den beiden Gruppen keine wesentlichen Unterschiede bestehen, auch wenn bei Berücksichtigung der Titer die Seren der Gruppe 1 (K 25 ausgenommen) im homologen Test stärker reagieren als mit desintegriertem Material. Auf jeden Fall fand sich kein Anhaltspunkt dafür, daß durch die mechanische Ruptur der Kerne neue, auf der Kernoberfläche nicht vertretene Antigendeterminanten frei und immunologisch wirksam werden, wie man hätte erwarten können. Die Seren beider Gruppen ergaben mit intakten Kernen eine einheitliche Fluoreszenz vom homogenen Typ. Der mit freiem Kernmaterial durchgeführt "Spot-Test" läßt naturgemäß

Kaninchen		Antigene							
		intakte Thymuskern		desintegrierte Thymuskern		denaturierte DNS		Rattenleber- schnitte	
		Fluoreszenz Stärke	Titer	Fluoreszenz Stärke	Titer	Fluoreszenz Stärke	Titer	Fluoreszenz Stärke	Titer
Gruppe 1	K 25	I +++	1:32	I +++	1:32	I -		I +++	1:8
	K 26	I ++	1:32	I ++	1:4	I -		I +++	1:8
	K 1	I ++	1:4	(I +)	(1:1)	I -		I ++	1:4
	K 2	I +++	1:8	(I +)	(1:1)	I -		I ++	1:8
Gruppe 2	K 27	I +++	1:32	I +++	1:32	I +++	1:8	I -	
	K 28	I +++	1:8	I +	1:16	I -		I -	
	K 3	I ++	1:8	I +	1:2	I -		I -	
	K 4	I ++	1:16	I ++	1:4	I -		I -	
Gruppe 3	K A	I ++	1:2	(I +)	(1:1)	I ++	1:4	I -	
	K B	I ++	1:32	I +	1:2	I +++	1:8	I -	
	K C	I -		I -		I ++	1:2	I -	
	K E	I +	1:4	(I +)	(1:1)	I ++	1:4	I -	
Kaninchen- normalserum		I -		I -		I -		I -	

Tabelle 6: Ergebnisse des indirekten Immunfluoreszenztests.

I +++ = starke Immunfluoreszenz in der angegebenen

I ++ = deutliche Immunfluoreszenz Serumverdünnung

I + = schwache Immunfluoreszenz

(I +) = zweifelhafter Befund

I - = keine Immunfluoreszenz

stark umrandete Felder = Homologes System.

eine strukturelle Zuordnung der Antikörper-Reaktion von vornherein nicht zu.

Dennoch fand sich zwischen den Seren der beiden Gruppen ein bemerkenswerter Unterschied nämlich in Bezug auf ihre Reaktionsfähigkeit mit Rattenleberschnitten. Hier konnte auch bei wiederholter Untersuchung regelmäßig nur mit den Seren der Gruppe 1 eine (homogene) Kernfluoreszenz erzielt werden, während aus der Gruppe 2 nicht einmal das Serum von K 27, an sich ein besonders guter Antikörperbildner, positiv war. Dies erschien umso erstaunlicher, als im Schnitt vorwiegend das Kerninnere angeschnittener Kerne zur Reaktion kommt, welches desintegriertem Kernmaterial, wie es zur Immunisierung der Tiere in Gruppe 2 diente, weitaus eher entsprechen sollte als intakten Thymuskernen.

Auch die Seren der Gruppe 3 mit ausschließlich DNS-spezifischen Antikörpern ließen eine Reaktion mit Leberschnitten vermissen. Möglicherweise bieten die Kerne der Leberschnitte diesen Antikörpern keine optimalen Voraussetzungen zur Bindung. Entsprechend wäre zu folgern, daß die Seren der Gruppe 1 im Gegensatz zu denen der Gruppe 2 vorwiegend Antikörper gegen andere Kernsubstrate und nur wenig oder keine DNS-spezifischen enthalten.

Der IFT mit denaturierter DNS bot als "Spot-Test" die durch das Fehlen strukturierter Elemente bedingten Schwierigkeiten bei der Beurteilung der Ergebnisse. Die Basisfluoreszenz sowie die durch Leerseren bedingten zusätzlichen Effekte erwiesen sich jedoch als nicht erheblich, so daß eindeutig positive Reaktionen mühelos feststellbar waren. Schwache und damit zweifelhafte positive Reaktionen wurden nicht berücksichtigt.

Erwartungsgemäß ergaben alle 4 Seren der Gruppe 3 jene charakteri-

stische granuliert fleckförmige Fluoreszenz, wie von TAN u.a. (69) beschrieben. Zusätzlich reagierte auch das Serum K 27 der Gruppe 2, ein weiterer Hinweis darauf, daß die Immunisierung mit desintegrierten Kernen in Abhängigkeit von ihrer Dauer und Intensität sowie vom individuellen Reaktionsvermögen der Tiere vorzüglich auch zur Bildung DNS-spezifischer Antikörper führt. Für die Immunisierung mit intakten Thymuskernen scheint dies, wenn überhaupt, nur in geringem Maße zuzutreffen, andernfalls wäre auch bei den Seren K 25 und 26 mit einem positiven Resultat zu rechnen gewesen.

Alle Versuche eines Antikörpernachweises in den Kaninchen-Immunseren im IFT mit nativer DNS blieben erfolglos.

3.1.4. Komplementbindungsreaktion.

Die prinzipielle Schwierigkeit bei der Untersuchung von Kaninchenseren in der KBR, nämlich die im Vergleich zu Humanseren wesentlich stärkeren antikomplementären Eigenschaften dieser Seren, konnte in der Mehrzahl der Fälle durch Zusatz von BSA (vergl. 2.3.4.1.) behoben werden. Bei 3 Seren (K 25, K 2, K 26) mit besonders hohem Gehalt an Immunglobulin G blieb diese Maßnahme allerdings erfolglos.

Die mit den Seren der Gruppe 1 und 2 gegenüber intakten und desintegrierten Thymuskernen (vergl. Tab.7) erhaltenen Befunde zeigten wiederum eine grundsätzliche Übereinstimmung. Auch eindeutige quantitative Unterschiede zwischen homologer und heterologer Reaktion ergaben sich nicht. Die insgesamt etwas höheren Titer in der Gruppe 2 könnten als Hinweis dafür gedeutet werden, daß diese Seren einen größeren Anteil von Antikörpern des Makroglobulintyps aufweisen. Gegenüber DNS fanden sich keine positiven Resultate. Im Hinblick auf die Befunde des IFT wären sie allenfalls bei K 27 zu erwarten gewesen. Die an den Seren der Gruppe 3 erhobenen Befunde bestätigten erneut, daß Antikörper gegen denaturierte DNS auch mit Thymuskernen reaktionsfähig sind.

Kaninchen- Immunseren	Antigene							
	intakte Thymuskerne		desintegrierte Thymuskerne		denaturierte DNS		native DNS	
	Stärke	Titer	Stärke	Titer	Stärke	Titer	Stärke	Titer
Gruppe 1	K 25	- - - - - Eigenhemmung - - - - -						
	K 26	S ++	1:10	S +	1:5	S -	S -	
	K 1	S ++	1:5	S +	1:5	S -	S -	
	K 2	- - - - - Eigenhemmung - - - - -						
Gruppe 2	K 27	- - - - - Eigenhemmung - - - - -						
	K 28	S ++	1:10	S ++	1:10	S -	S -	
	K 3	S +++	1:20	S ++	1:40	S -	S -	
	K 4	S ++	1:10	S ++	1:20	S -	S -	
Gruppe 3	K A	S ++	1:10	S +	1:5	S +	1:5	S -
	K B	S +	1:5	S ++	1:10	S +	1:10	S -
	K C	S +	1:5	S ++	1:10	S +	1:5	S -
	K E	S ++	1:10	S +	1:5	S +	1:10	S -
Kaninchen- normal- seren	1	S -		S -		S -	S -	
	2	S -		S -		S -	S -	
	3	S -		S -		S -	S -	
	4	S -		S -		S -	S -	

Tabelle 7: Ergebnisse der Komplementbindungsreaktion.

S ++ = vollständige Erythrocytensedimentation, keine Hämolyse

S + = beginnende Hämolyse in der angegebenen Serumverdünnung

S - = vollständige Hämolyse

stark umrandete Felder = homologes System.

Das unterschiedliche Verhalten dieser Seren gegenüber nativer bzw. denaturierter DNS steht im Einklang mit den Befunden von TAN u.a. (69). Erklärt man es ausschließlich auf der Basis differenter Haptendeterminanten bei diesen beiden Substraten, erhebt sich freilich die Frage, auf welche Weise für denaturierte DNS spezifische Antikörper mit frisch präparierten Thymuskernen in Reaktion treten; eine Frage, welche anhand dieser Untersuchungen nicht beantwortet werden kann. Der in diesem Zusammenhang sehr nützlichen Gewinnung von Antikörpern gegen native DNS steht das Fehlen eines geeigneten Verfahrens zur Kopplung dieser Substanz an einen Träger entgegen.

3.1.5. Absorptionsversuche.

Absorptionsversuche wurden mit den Seren der Kaninchen 25, 27 und B, welche sich als relativ gute Antikörperbildner gezeigt hatten, durchgeführt. Nach quantitativer Absättigung mit intakten Thymuskernen ergaben diese Seren im IFT gegen intakte und desintegrierte Thymuskern, denaturierte DNS sowie Rattenleberschnitte eine eindeutig negative Reaktion. Die Kerne erwiesen sich demnach auch gegenüber DNS-spezifischen Antikörpern als spezifisches Immunadsorbens.

Für die isolierte Absorption DNS-spezifischer Antikörper diene an Bentonitpartikel gebundene denaturierte DNS wie von BERTRAMS (11) beschrieben. Nach der Absättigung verhielt sich das Serum K B gegen alle Antigene des IFT negativ, K 27 verlor die Reaktionsfähigkeit mit denaturierter DNS, reagierte aber ebenso wie K 25 weiterhin, wenn auch quantitativ geringer, mit Thymuskernen bzw. Kernsubstrat (Tab. 8).

Insgesamt weisen die hier mitgeteilten Ergebnisse darauf hin, daß die Kaninchenseren der Gruppen 1 und 2, immunisiert mit intakten bzw. desintegrierten Thymuskernen, Antikörper gegen mehrere Kernsubstrate enthalten. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen dürften

Kaninchen- immunseren	Antigene							
	intakte Thymuskern		desintegrierte Thymuskern		denaturierte DNS		Rattenleber- schnitte	
	Absorption mit denaturierter DNS-Bentonit							
	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach
Gruppe 1 K 25	+++	++	+++	++	-	-	+++	++
Gruppe 2 K 27	+++	++	+++	++	+++	-	-	-
Gruppe 3 K B	+++	-	++	-	+++	-	-	-

Tabelle 8 : Ergebnisse des indirekten Immunofluoreszenztest an Kaninchenimmunseren vor und nach Absorption mit denaturierter DNS-Bentonit-Partikeln.

+++ = starke Immunofluoreszenz im unverdünnten Serum

++ = deutliche Immunofluoreszenz im unverdünnten Serum.

- = Keine Immunofluoreszenz im unverdünnten Serum.

von individuellen Besonderheiten der Immunantwort abgesehen, eher quantitativer als qualitativer Art sein. Die Seren der Gruppe 3, aufgrund der Immunisierung nur mit Antikörpern gegen denaturierte DNS ausgestattet, vermögen fluoreszenzserologisch und in der KBR auch mit Kernen zu reagieren. Es ist deshalb anzunehmen, daß die von anderer Seite (69) demonstrierten Unterschiede bei den Hapten-determinanten von nativer bzw. denaturierter DNS nur partieller Natur und damit die Voraussetzungen zu Kreuzreaktionen gegeben sind.

3.2. Untersuchungen zum Nachweis von Antinuklearfaktoren in Humanseren.

Zum Vergleich mit den an Kaninchenimmenserum erzielten Ergebnissen wurde eine Reihe von im IFT mit Kaninchen- oder Meerschweinchenleberschnitten positiven Humanseren in die Studie mit einbezogen. Es handelte sich dabei um Material von Patienten mit klinisch zumeist gesichertem systemischen Lupus erythematoses (SLE) bzw. rheumafaktorpositiver chronischer Polyarthritits (CP), welches ausnahmslos das Bild einer homogenen Kernfluoreszenz ergab.

3.2.1. Agargel-Doppeldiffusion und Latex-Nukleoproteintest.

Im Test nach Ouchterlony mit intakten oder desintegrierten Thymuskernen sowie denaturierter DNS konnte mit keinem der geprüften Seren, auch bei verlängerter Inkubationszeit bis zu 12 Tagen, eine Präzipitation festgestellt werden. Entsprechend negative Resultate fanden sich in der passiven Agglutination. Da der Latex-Test erfahrungsgemäß und wie auch die Ergebnisse der Kaninchenserum ausweisen (Tab.5) hauptsächlich auf Anti-DNS-Antikörper anspricht, erscheint der Schluß gerechtfertigt, daß die geprüften Humanseren keine derartigen Antikörper enthielten bzw. allenfalls in sehr geringer Menge.

3.2.2. Indirekter Immunofluoreszenztest.

Im IFT erschien vor allem der Vergleich der Reaktionsfähigkeit

Humanseren			Antigene			
			intakte Thymuskern		Meerschweinchenleberschnitte	
Nr	ANF*	Diagnose	Stärke	Titer	Stärke	Titer
188	+++	SLE	I +++	1:64	I +++	1:4096
18685	+++	SLE	I +	1:2	I +++	1:4096
6164	+++	SLE	I ++	1:32	I +++	1:256
1888	+++	SLE	I ++	1:8	I +++	1:2048
6448	+++	SLE	I +	1:4	I +++	1:2048
19170	+++	SLE	I ++	1:2	I +++	1:256
10526	+++	SLE	I +	1:4	I +++	1:256
18858	+++	SLE	I ++	1:2	I +++	1:4096
7517	+++	SLE-Verdacht	I ++	1:2	I +++	1:1024
14268	+++	SLE-Verdacht	I +++	1:64	I +++	1:512
12531	++	CP	I +	1:2	I ++	1:32
12938	++	CP	I +	1:2	I ++	1:64
12934	++	CP	I +	1:2	I ++	1:16
12767	+++	CP	I +	1:4	I +++	1:512
736	+++	CP-Verdacht	I +	1:8	I +++	1:64
5502	-	Normalserum	I -		I -	
6337	-	Normalserum	I -		I -	
13376	-	Normalserum	I -		I -	

Tabelle 9 : Ergebnisse von Humanseren im Immunofluoreszenztest

mit intakten Thymuskernen bzw. Meerschweinchenleberschnitten.

I + = schwache Immunofluoreszenz
 I ++ = deutliche Immunofluoreszenz
 I +++ = starke Immunofluoreszenz

} in der angegebenen Serum-
 verdünnung

I - = keine Immunofluoreszenz

* = Ergebnis im IFT mit Leberschnitten (unverdünntes Serum)

gegenüber intakten Thymuskernen und Leberschnitten von Interesse. Anhand der Ergebnisse von 15 Humanseren (Tab.9) zeigte sich eindeutig, daß mit den angeschnittenen Kernen der Leberzellen weitaus höhere Titer auftreten als mit Thymuskernen, ganz im Gegensatz zum Verhalten der Kaninchenimmunsere (vergl. Tab.6). Auffällig war ferner, daß die Titerrelationen der einzelnen Seren gegenüber den beiden Antigenen nicht einheitlich sind, der Anteil von Antikörpern, der mit Thymuskernen in Reaktion treten kann, also gemessen an der Gesamtkonzentration der Antinukleärfaktoren sehr unterschiedlich sein kann (z.B. Seren 188 und 18685). Nebenbei ergibt sich aus diesen Ergebnissen der Hinweis, daß die parallele Untersuchung mit beiden Antigenen eine Differenzierung des positiven Befundes ermöglicht, deren klinische Signifikanz noch zu prüfen wäre.

3.2.3. Komplementbindungsreaktion.

Die 15 Humanseren wurden ferner in ihrem Verhalten in der KBR mit verschiedenen Antigenen getestet. Der Zusatz von BSA war hierbei nicht erforderlich. Nur eines der Seren (Tab.10) zeigte eine Eigenhemmung infolge starker Immunglobulin-G-Vermehrung und entsprechend hoher antikomplementärer Aktivität.

Mit nativer DNS reagierten fast alle SLE-Seren, wenn auch mit sehr niedrigen Titerwerten. Die durchwegs negativen Befunde der CP-Seren dürften sich daraus erklären, daß DNS-spezifische Antikörper in Humanseren in der Regel nur im akuten Stadium eines SLE nachweisbar werden. Möglicherweise sind neben diesen qualitativen aber auch quantitativen Gründe mit maßgebend.

Denaturierte DNS führte demgegenüber nur bei einem Serum zu positiver Reaktion. Antikörper dieser Art sind bei Humanseren bekannt selten. Die bereits diskutierte Wahrscheinlichkeit einer partiellen Antigen-

Humanseren			Antigene					
			intakte Thymuskern		native DNS		denaturierte DNS	
Nr.	ANF*	Diagnose	Stärke	Titer	Stärke	Titer	Stärke	Titer
188	+++	SLE	- - -	- -	Eigenhemmung		- - -	- - -
18685	+++	SLE	S -		S +	1:5	S -	
6164	+++	SLE	S -		S +	1:5	S -	
1888	+++	SLE	S +	1:20	S +	1:5	s +	1:5
6448	+++	SLE	S +	1:10	S +	1:5	S -	
19170	+++	SLE	S -		S +	1:5	S -	
10526	+++	SLE	S -		S -		S -	
18858	+++	SLE	S -		S +	1:5	S -	
7517	+++	SLE-Verdacht	S -		S +	1:5	S -	
14268	+++	SLE-Verdacht	S -		S +	1:5	S -	
12531	++	CP	S -		S -		S -	
12938	++	CP	S -		S -		S -	
12934	++	CP	S +	1:5	S -		S -	
12767	+++	CP	S +	1:5	S -		S -	
736	+++	CP-Verdacht	S -		S -		S -	
5502	-	Normalserum	S -		S -		S -	
6337	-	Normalserum	S -		S -		S -	
13376	-	Normalserum	S -		S -		S -	

Tabelle 10: Ergebnisse von Humanseren in der Komplementbindungsreaktion mit Thymuskernen bzw. DNS.

S + = vollständige Erythrocytensedimentation, keine Hämolyse

S - = vollständige Hämolyse

* = Ergebnis im IFT mit Meerschweinchenleberschnitten
(unverdünntes Serum)

gemeinschaft der beiden DNS-Formen findet Unterstützung durch Beobachtungen von TAN u.a. (69) anlässlich einer Studie mit Humanserum. Das gegensätzliche Verhalten im Vergleich zu den Kaninchenimmunseren der Gruppe 3 (vergl. Tab. 7) findet eine zwanglose Erklärung im Immunisierungsmodus dieser Tiere.

Ein deutlicher Unterschied zwischen Human- und Tierseren ergab sich jedoch bei der KBR mit Thymuskernen. Kaninchenimmunseren reagierten in diesem System ausnahmslos (vergl. Tab.7), von den 15 ANF-positiven Humanserum dagegen nur 4. In Verbindung mit der bereits erwähnten Situation beim IFT mit Kernen bzw. Schnitten, daß wesentlich quantitative Differenzen bestehen, welche auf grundsätzlich verschiedenartige Voraussetzungen bereits bei der Induktion der Antikörperbildung hindeuten. Die bei einer Autoimmunerkrankung gegebene Lage läßt sich offensichtlich mit den Bedingungen einer experimentellen Immunisierung in wesentlichen Punkten nicht gleichsetzen. Möglicherweise führt deshalb die Zufuhr von Kernmaterial bei Tieren nicht zur Erkrankung, wie MIESCHER (44) feststellte.

Orientierende Versuche zur Absorption von Humanserum mit nativer oder denaturierter DNS gebunden an Bentonit bestätigten die hinlänglich bekannte Tatsache, daß die im IFT mit Leberschnitten reaktionsfähigen Antikörper des Humanserums nicht quantitativ abgesättigt werden können. In einigen Fällen ergaben sich Hinweise auf eine gewisse Verminderung der Reaktionsfähigkeit im IFT.

Diskussion

Wie aus der Übersichtstabelle 11 hervorgeht, haben alle im Rahmen dieser Studie immunisierten Tiere mit der Bildung humoraler kernspezifischer Antikörper reagiert. Antigenart, -dosis und Aufbereitung sowie Applikation können somit prinzipiell als geeignet betrachtet werden. Die quantitativ verhältnismäßig geringe Antikörper-Ausbeute entspricht im Wesentlichen der Mitteilung anderer Autoren. Soweit es die Immunisierung mit intakten Zellkernen angeht, kann aus den Ergebnissen von MIESCHER u.a. (44) entnommen werden, daß weder über 12 Wochen ausgedehnte Antigengaben noch deren i.v. Injektion in hohen Dosen wesentlich bessere Erfolge zeitigten.

Desintegriertes Kernmaterial in Form eines Aluminiumpräzipitats zeigt hinsichtlich quantitativer Aspekte der Immunantwort ähnliche immunogene Eigenschaften wie intakte Kerne. Beide Antigenpräparate führten im Übrigen bei den Tieren zu keinerlei äußerlich erkennbaren Schäden, so daß die von MIESCHER u.a. (44) erwähnten Tierverluste wahrscheinlich durch interkurrente Infektionen, in einigen Fällen vielleicht auch durch die i.v. Applikation von Kernen bedingt waren.

Denaturierte DNS im Komplex mit methyliertem Rinderserumalbumin hat sich seit den ersten Versuchen von PLESCIA u.a. (53) als ein vielfach bewährtes Verfahren zur Gewinnung DNS-spezifischer Antikörper erwiesen. Im Vergleich zu den hier mitgeteilten Antikörpertitern lassen die Befunde von TAN und NATALI (69), insbesondere aber die von STOLLAR und SANDBERG (64), welche die Immunisierung auf einen Zeitraum von 8 Monaten ausdehnten, darauf schließen, daß auf diese Weise wesentlich mehr komplementbindende Antikörper induziert werden

	Gruppe 1					Gruppe 2					Gruppe 3				
	K 25	K 26	K 1	K 2		K 27	K 28	K 3	K 4		K A	K B	K C	K E	
<u>Immunodiffusion</u>															
intakte Kerne	+	+	0	+		+	0	0	0		+	+	0	+	
desintegrierte Kerne	+	+	0	+		+	0	0	0		+	+	0	+	
denaturierte DNS	0	0	0	0		0	0	0	0		0	0	0	0	
<u>Latex-Test</u>															
DNS-Nukleoprotein	0	0	0	0		+	0	0	0		+	+	0	+	
<u>Immunofluoreszenz</u>															
intakte Kerne	1:32	1:32	1:4	1:8		1:32	1:8	1:8	1:16		1:2	1:32	0	1:4	
desintegrierte Kerne	1:32	1:4	(1:1)	(1:1)		1:32	1:16	1:2	1:4		(1:1)	1:2	0	(1:1)	
denaturierte DNS	0	0	0	0		1:8	0	0	0		1:4	1:8	1:2	1:4	
Rattenleberschnitte	1:8	1:8	1:4	1:8		0	0	0	0		0	0	0	0	
<u>Komplementbindungsreaktion</u>															
intakte Kerne	E	1:10	1:5	E		E	1:10	1:20	1:10		1:10	1:5	1:5	1:10	
desintegrierte Kerne	E	1:5	1:5	E		E	1:10	1:40	1:20		1:5	1:10	1:10	1:5	
denaturierte DNS	E	0	0	E		E	0	0	0		1:5	1:10	1:5	1:10	
native DNS	E	0	0	E		E	0	0	0		0	0	0	0	

Tabelle 11: Übersicht der mit Kaninchen-Immunsereen erhaltenen Ergebnisse.

+ = positive Reaktion im unverdünnten Serum
 0 = negative Reaktion im unverdünnten Serum
 (1:1) = fragliche positive Reaktion im unverdünnten Serum
 stark umrandete Felder = homologes Testsystem.
 E = Eigenhemmung des Serums

können.

Insgesamt ist zur Frage der Immunisierung festzustellen, daß wahrscheinlich nur eine häufige und langfristige Stimulierung des Immunsystems über 12 Monate und mehr die Aussicht eröffnet, echte Hyperimmunseren mit einem Antikörpergehalt von 0,5 mg/ml Serum und mehr zu produzieren. Solche Seren würden für die Analyse komplexer Antikörperspektren, wie sie bei kernspezifischen Antiseren gegeben sind, weitaus günstigere Voraussetzungen schaffen. Außerdem würden die Verhältnisse wenigstens zeitlich den Bedingungen besser angepaßt, wie sie wahrscheinlich bei der Autoimmunisierung des Menschen gegeben sind. Über die immunologische Anlaufzeit eines SLE besteht zwar noch keine Klarheit, jedoch lassen Studien wie von PUTKONEN u.a. (54) darauf schließen, daß die Antinuklearfaktoren im Serum bei der klinischen Manifestation eines SLE in der Regel das Ergebnis eines langwierigen Immunisierungsprozesses sind.

Aus Tabelle 11 läßt sich ferner ableiten, daß zur ausreichenden Beurteilung der humoralen Immunantwort nicht nur verschiedene Antigene, sondern auch mehrere serologische Methoden zweckmäßig und gelegentlich auch erforderlich sind. Dies gilt naturgemäß insbesondere für die Untersuchung antikörperschwacher Seren. Als Beispiel sei auf Serum C hingewiesen, welches praktisch nur in der Komplementbindungsreaktion nachweisbare Antikörper enthält. Vorteilhaft erscheint vor allen Dingen eine Kombination von IFT und KBR. Beide Verfahren zeichnen sich durch eine relativ hohe Sensitivität aus, welche bei der KBR nach Angaben von MIESCHER u.a. (44) durch die Verwendung von Rinderkonglutinin anstelle eines hämolytischen Ambozeptors (43) noch verbessert werden kann. Ein zweiter Grund, der für die erwähnte Kombination spricht, ist

darin zu sehen, daß mit dem IFT Antikörper der 7S-Klasse, mit der KBR dagegen solche der 19S-Klasse optimal erfaßt werden können.

Die Immunodiffusion liefert im wesentlichen eine Alternative zum IFT, hat ihm gegenüber aber den Nachteil einer erheblich geringeren Empfindlichkeit. Die mit Ausnahme von K 27 unterschiedlichen Befunde der Seren der Gruppe 2 im Ouchterlony-Test bzw. im IFT sind damit zu erklären. Auf technische Gründe, wahrscheinlich auf eine ungenügende Diffusionsfähigkeit der denaturierten DNS, sind die durchwegs negativen Ergebnisse aller Seren mit diesem Antigen in der Immunodiffusion zurückzuführen. An sich wären von K 27 und den Seren der Gruppe 3 positive Resultate zu erwarten. Die von TAN und NATALI (69) in diesem Testsystem erhaltenen positiven Reaktionen konnten somit nicht reproduziert werden.

Der Nukleoprotein-Latextest erweist sich gegenüber Kaninchenimmunsereen wie auch bei Humanseren als wenig ergiebiges Verfahren. Da das Prinzip der passiven Latexagglutination an sich eine sehr empfindliche serologische Methode darstellt, kann die Ursache für die geringe Reaktionsfähigkeit nur in dem zur Sensibilisierung der Latexpartikel verwendeten Substrat zu suchen sein. Wie die durch die positiven Resultate der Seren aus Gruppe 3 gestützten Erfahrungen mit Humanseren zeigen, reagiert das Substrat nicht wie zu erwarten mit DNS-Histonkomplexspezifischen Antikörpern, sondern nur mit Antikörpern spezifisch für denaturierte DNS in relativ hohen Konzentrationen, wie sie auch bei Humanseren nur vereinzelt, vor allem im akuten Stadium des SLE, gefunden werden.

Der dritte der zur Diskussion stehenden Gesichtspunkte betrifft die Spezifität der Immunantwort, d.h. die Frage, gegen welche Kernsubstrate

bzw. deren Antigendeterminanten die Antikörper der Tierimmunseren gerichtet sind. MIESCHER u.a. (44) sind in ihrer bereits 1959 durchgeführten Studie zu dem Schluß gekommen, daß experimentell gewonnene Antiseren nach Immunisierung mit Zellkernen oder isoliertem Nukleoprotein sich im wesentlichen mit SLE-Seren vergleichen lassen. Das ist richtig insofern, als in beiden Seren vorwiegend komplexspezifische Antikörper gegen DNS-Histon vorhanden sind. Unabhängig vom Immunisierungsmodus lassen sich in beiden Arten von Tierimmunseren zum Teil auch Antikörper mit DNS- oder Histonspezifität nachweisen. Diese Übereinstimmung zwischen den mit Zellkernen bzw. Nukleoprotein gewonnenen Antiseren entspricht den Eigenschaften der Seren von Gruppe 1 und 2. Auch hier lassen sich mit den verschiedenen Testmethoden keine qualitativen Unterschiede nach Immunisierung mit intakten oder desintegrierten Kernen feststellen. DNS-spezifische Antikörper finden sich allerdings nur im Serum K 27. Dennoch bleibt die Tatsache, daß 3 der 4 Seren aus Gruppe 1 im homologen System des IFT besser reagierten als mit desintegrierten Kernen. Die Titerdifferenzen erscheinen aber nicht groß genug um daraus definitive Schlüsse ziehen zu können. Das Reaktionsbild gegenüber intakten Kernen ist jedenfalls bei den Seren beider Gruppen einheitlich (vergl. Abb.3), ebenso im Spottest mit desintegriertem Kernmaterial, soweit hierbei überhaupt die Möglichkeit unterschiedlicher Reaktionsformen in Betracht gezogen werden kann.

Unter den Seren der Gruppen 1 und 2 finden sich nur bei K 27 Hinweise dafür, daß außer komplexspezifischen Antikörpern auch andere, in diesem Falle DNS-spezifische, Antikörper vorhanden sind. Trotzdem ergibt dieses Serum in der Immunodiffusion mit desintegrierten Kernen nur eine Präzipitationslinie wie die Seren der Gruppe 1 bzw. 3. Es muß

demnach angenommen werden, daß die DNS im Kernmaterial ganz oder wenigstens weitgehend komplexgebunden vorliegt, so daß die beiden Antigen-Antikörper-Reaktionen nicht räumlich getrennt ablaufen können, zumal durch die positiven Ergebnisse der Seren aus Gruppe 3 die Reaktionsfähigkeit der DNS in diesem Material sichergestellt ist.

Im Gegensatz zu den anderen Seren müssen die der Gruppe 3 aufgrund des Immunisierungsantigens von vornherein als monospezifisch gegen DNS gerichtet betrachtet werden. Ihre Untersuchung mit verschiedenen Antigenpräparaten kommt somit nicht nur einer Antikörperanalyse, sondern unter Umständen eher einer Antigenanalyse gleich. Der wie bereits erwähnt nur für den Nachweis DNS-spezifischer Antikörper geeignete Latextest, vor allem aber IFT und KBR mit denaturierter DNS sind für diese Seren als homologe Testsysteme zu betrachten und bringen auch die zu erwartenden Ergebnisse. Die Gründe für das Versagen des Ouchterlony-Tests mit denaturierter DNS sind bereits erörtert. Die Reaktionslosigkeit dieser Seren in der KBR mit nativer DNS entspricht den Befunden u.a. von TAN und NATALI (69), STOLLAR und SANDBERG (64) berichten zwar bei ihren Seren von mit DNS-MBSA immunisierten Kaninchen von einer positiven Reaktion bei Einsatz sehr hoher Dosen nativer DNS, führen dies aber auf Beimengungen von denaturiertem Material zurück, wie sie wiederum von TAN und NATALI (69) chromatographisch in DNS-Präparaten nachgewiesen worden sind. Die Seren der Gruppe 3 zeigen auch im IFT mit nativer DNS keine Reaktion, insbesondere kann das bei der Untersuchung bestimmter SLE-Seren von TAN und NATALI (69) beschriebene charakteristische Bild einer strangförmigen Fluoreszenz nicht dargestellt werden.

Die Seren der Gruppe 3 sind somit als streng spezifisch für denaturierte DNS anzusehen. Diese Feststellung erscheint besonders inter-

essant, weil diese Seren in der Immunodiffusion, dem IFT und der KBR übereinstimmend mit intakten oder desintegrierten Thymuskernen reagieren. Daraus wäre zwingend zu folgern, daß die DNS in diesen Antigenpräparaten wenigstens zu einem erheblichen Teil in denaturierter Form vorliegen muß. Diese erstaunlich anmutende Feststellung wird zudem noch durch die Ergebnisse der Absorptionsversuche gestützt. Wie erwähnt lassen sich die Seren aller 3 Gruppen, also auch solche monospezifisch für denaturierte DNS, mit Thymuskernen komplett absättigen. Dies gilt nach HOLMAN und KUNKEL (30) auch für die Absorption mit isoliertem Nukleoprotein. Unter diesen Umständen bestehen wenig Aussichten zur experimentellen Gewinnung von Antikörpern gegen native DNS, falls es nicht doch noch gelingt, dieses Substrat ähnlich wie die denaturierte Form an einen Träger zu koppeln.

Die erwähnte Feststellung von MIESCHER u.a. (44), daß sich Tierimmunseren und Seren SLE-Kranker hinsichtlich der Qualität ihrer Antikörper vergleichen lassen, ist in den bereits erörterten Punkten zutreffend. Ergebnisse späterer Studien einschließlich der hier mitgeteilten Befunde haben jedoch einige wesentliche Unterschiede zutage gefördert. In dieser Beziehung ist zunächst auf die Bemerkung von STOLLAR und SANDBERG (64) hinzuweisen, daß Tiere auf die Immunisierung mit einem bestimmten Kernmaterial qualitativ weitgehend einheitlich reagieren, während die Antikörperspezifitäten im Humanserum bei SLE oder auch anderen mit der Bildung von Antinuklearfaktoren einhergehenden Konditionen in sehr verschiedenartigen Kombinationen aufzutreten pflegen. Daraus kann abgeleitet werden, daß die Bedingungen für die Induktion einer Autoimmunantwort beim Menschen sehr variabel sind, d.h. Kernsubstrate in von Fall zu Fall unterschiedlicher Form und Zusammensetzung auf das Immunsystem einwirken. Damit wird naturgemäß

der Vergleich von Human- und Tierseren von vornherein erheblich erschwert. Trotzdem können einige spezielle Punkte herausgestellt werden. Einer davon betrifft die Anti-DNS-Antikörper. Wie aus Tab.10 zu ersehen, enthalten im IFT mit Leberschnitten positive Humanserum nur zum Teil in der KBR mit DNS nachweisbare Antikörper. Überwiegend handelt es sich dabei um solche gegen native DNS, in einem Falle (Serum 1888) zugleich auch um Antikörper gegen die denaturierte Form. Dies deckt sich mit den Angaben anderer Autoren wie TAN und NATALI (69), SELIGMANN (58), BARBU u.a. (6), STOLLAR und LEVINE (62), STOLLAR u.a. (63) sowie STOLLAR und SANDBERG (64), wonach in Humanserum Antikörper gegen beide Formen der DNS einzeln oder gemeinsam vorkommen können. Unter den in vivo Gegebenheiten der Autoimmunisation kann somit auch native DNS eine Immunogenität zeigen, die bisher im Tierexperiment nicht zu reproduzieren war. Nach STOLLAR und SANDBERG (64) besteht ein weiterer Unterschied insofern, als die DNS-spezifischen Antikörper des Tieres überwiegend der 19S-Klasse, die im Humanserum dagegen vorwiegend der 7S-Klasse angehören. Dies kann als Hinweis darauf aufgefaßt werden, daß die Human-Antikörper Produkte langfristiger Immunisierungsprozesse sind, möglicherweise liegen hierbei auch die Antigene in einer anderen physikalischen Zustandsform vor.

Ein zweiter Gesichtspunkt ergibt sich aus dem Vergleich der Ergebnisse von Tier- und Humanserum im IFT mit Thymuskernen bzw. Leberschnitten (Tab.6 u.9). Gegenüber Thymuskernen zeigen Humanserum und Kaninchenserum der Gruppen 1 und 2 vergleichbare Titer. Gegenüber Rattenleberschnitten - entsprechende Befunde lassen sich auch z.B. mit Meerschweinchen- oder Kaninchenleber darstellen - reagieren dagegen Humanserum vor allem bei SLE mit sehr hohen Titern, während von

den Tierseren nur die Gruppe 1 und zwar in geringem Umfange, reaktiv sind. Dieser deutlich ausgeprägte und höchstwahrscheinlich nicht nur quantitative, sondern vorwiegend qualitative Unterschied läßt sich allerdings anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht ausreichend spezifizieren. Das mit allen getesteten Human- und Tierseren (Gruppe 1) erhaltene Reaktionsbild mit Thymuskernen ist einheitlich im Sinne einer homogenen Kernfluoreszenz zu deuten (vergl. Abb.3). Gleiches gilt für die Humanseren in ihrer Reaktion mit Leberschnitten (Abb.4), während bei Kaninchenseren (Abb.2) zwar ebenfalls eine die gesamte Kernfläche mit Ausnahme der Nucleoli einschließende Fluoreszenz auftritt, jedoch mit Zonen unterschiedlicher Intensität. Das Bild erinnert einigermaßen an die Reaktion vom fleckigen ("shaggy") Typ, welche nach CASALS (13) wahrscheinlich durch Anti-DNS-Antikörper bedingt ist. Die Vermutung, daß es sich bei den Tierseren vorwiegend um Antikörper dieser Spezifität handelt, steht jedoch im Widerspruch zu ihren Ergebnissen z.B. im IFT mit denaturierter DNS. Immerhin erscheint zunächst die Annahme einer qualitativ unterschiedlichen Kombination von Antikörpern in Tier- und Humanseren - letztere enthalten hauptsächlich komplexspezifische Antikörper gegen DNS + Histon (FRIOU (17) - gerechtfertigt.

Insgesamt weisen die in der Reaktion von Human- und Tierseren feststellbaren Unterschiede darauf hin, daß durch die Injektion von Zellkernen, Nukleoprotein oder DNS in immunologisch aktiver Form beim Tier die Verhältnisse, wie sie bei der Autoimmunisierung des Menschen trotz aller Unterschiedlichkeit im Einzelfalle gegeben sind, noch nicht ausreichend reproduziert werden können. Darin mag auch der Grund dafür zu suchen sein, daß, wie bereits MIESCHER u.a. (44) feststellten,

die Zufuhr von Kernmaterial beim Tier zu keinen histologisch faßbaren Veränderungen im Sinne eines SLE führt. Vielleicht ließe sich dieses im Hinblick auf die ätiologische Klärung des SLE angestrebte Ziel erreichen, wenn es gelingt, ein Material zur Immunisierung bereitzustellen, welches den bei pathologischem Zelltod und -abbau im Organismus entstehenden Substraten besser entspricht.

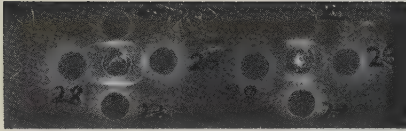


Abb. 1: Agargel-Doppeldiffusion.

Seren der Kaninchen 25, 26, 27 und 28 (im Uhrzeigersinn)
gegen links intakte Thymuskern (5 mg/ml),
rechts desintegrierte Thymuskern (5 mg/ml).

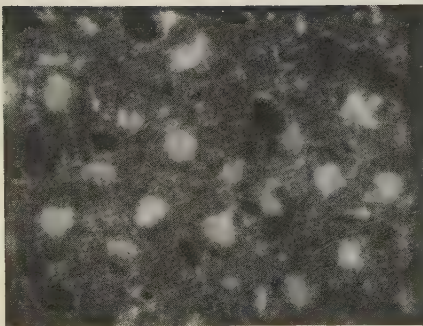


Abb. 2: Kaninchen 25, immunisiert mit intakten Thymuskernen.
Indirekter IFT mit Rattenleberschnitt.
Vergrößerung 500 x.

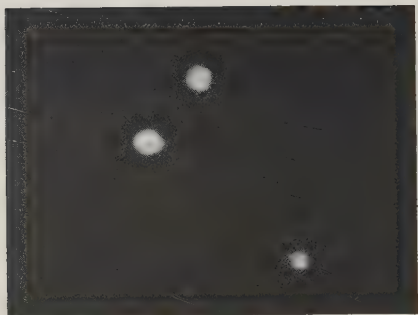


Abb. 3: Kaninchen 25, immunisiert mit intakten Thymuskernen.
Indirekter IFT mit intakten Thymuskernen. Vergrößerung 500 x.

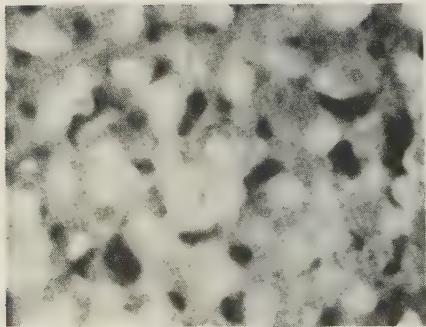


Abb. 4: Serum 6164, SLE-Patient.
Indirekter IFT mit Meerschweinchenleberschnitt.
Vergrößerung 500 x.

Zusammenfassung

Es wurde die Bildung kernspezifischer Antikörper bei 12 Kaninchen nach Immunisierung mit isolierten intakten Thymuskernen (Gruppe 1), desintegrierten Kernen (Gruppe 2) und denaturierter DNS aus Kalbsthymus im Komplex mit methyliertem Rinderserumalbumin (Gruppe 3) analysiert. Die Untersuchungen wurden mittels Immunodiffusion im Agar- bzw. Agarosegel, indirekter Immunofluoreszenz und Komplementbindungsreaktion jeweils mit mehreren Kernantigenen sowie im Nukleoprotein-Latex-Test durchgeführt.

Die Seren der Gruppen 1 und 2 zeigten beim Vergleich auch zwischen beiden Gruppen weitgehend einheitliche Ergebnisse, von quantitativen Unterschieden abgesehen. Ein Freiwerden zusätzlicher Antigendeterminanten nach mechanischer Kernruptur konnte somit nicht demonstriert werden.

Die Seren der Gruppe 3 sowie eines aus Gruppe 2 reagierten in mehreren serologischen Verfahren mit denaturierter, aber nicht mit nativer DNS. Ihre negative Reaktion mit diesem Antigen im Ouchterlony-Test dürfte auf einer ungenügenden Diffusionsfähigkeit des DNS-Präparats beruhen.

Die Seren der Gruppe 3 ergaben ferner einheitlich positive Resultate mit intakten bzw. desintegrierten Thymuskernen. Es war demnach anzunehmen, daß die DNS in diesen Antigenpräparaten wenigstens zum Teil in denaturierter Form vorliegt. Diese Annahme wurde gestützt durch die Ergebnisse von Absorptionsversuchen mit intakten Thymuskernen, welche zu einer kompletten Absättigung der Seren aller 3 Gruppen führten, sowie durch die Feststellung, daß die Immunisierung

mit Kernen, intakt oder desintegriert, keine Induktion von Antikörpern gegen native DNS induzierte.

Insgesamt zeigte es sich, daß zu einer umfassenden Antikörperanalyse tierexperimentell gewonnener Antiseren der Einsatz mehrerer Verfahren, insbesondere die Kombination von indirekter Immunofluoreszenz und Komplementbindungsreaktion, zweckmäßig ist.

Der Vergleich zwischen Tierseren und Humanseren, vorwiegend von Patienten mit SLE, bestätigte die Erfahrung, daß die Autoimmunisierung zu wesentlich variableren Antikörperspektren führt als die relativ einheitliche Immunantwort im Tierexperiment. Grundlegende Unterschiede ergaben sich in Übereinstimmung mit anderen Autoren insofern, als im Humanserum nicht selten auch Antikörper spezifisch für die Antigendeterminanten der nativen DNS zu finden sind, sowie hinsichtlich der Immunglobulinklasse von Antinuklearfaktoren, welche im Menschen hauptsächlich zu IgG, Beim Tier dagegen zu IgM gehören.

Ein weiterer Unterschied konnte demonstriert werden anhand der verschiedenartigen Reaktionsfähigkeit im indirekten Immunofluoreszenztest mit Thymuskernen bzw. Leberschnitten. Bei vergleichbaren Ergebnissen mit Thymuskernen ergaben Humanseren eine aufgrund der Titerwerte etwa sechsfach stärkere Reaktion mit den Kernen des Leberschnitts gegenüber den Tierseren aus Gruppe 1. Die Seren der Gruppen 2 und 3 blieben mit Leberschnitten negativ. Gewisse Differenzen des fluoreszenzserologischen Bildes ließen qualitative Unterschiede vermuten, welche jedoch mit den bisher vorliegenden Ergebnissen nicht näher spezifiziert werden können.

- 6 BARBU, E., SELIGMAN, M., JOLY, M.:
Réactions entre des acides désoxyribonucléiques
diversement dénaturés ou dégradés et des
anticorps anti-acide désoxyribonucléique du
sérum de malades atteints du lupus érythema-
teux disséminé. Ann.Inst.Past. 99, 695 (1960)
- 7 BARNETT, E.V., CONDEMI, J.J., LEDDY, J.P., VAUGHAN, J.H.:
 Gamma_2 , gamma_{1A} and gamma_{1M} antinuclear
factors in human sera.
J. Clin.Invest. 43, 277 (1964)
- 8 BARNETT, E.V., NORTH, A.F., CONDEMI, J.J., JACOX, R.F., VAUGHAN,
J.H.: Antinuclear factors in systemic lupus
erythematosus and rheumatoid arthritis.
Ann. intern.Med. 63, 277 (1965)
- 9 BECK, J.S.: Variations in the morphological patterns of
"autoimmune" nuclear fluorescence.
Lancet I, 1203 (1961)
- 10 BEICKERT, A.: Das Lupus erythematoses-Phänomen und die
antinukleären Faktoren.
VEB G.Fischer Verlag, Jena 1974
- 11 BERTRAMS, J., KUWERT, E., ACHELNIK, C.:
Lupus erythematoses: DNS-Bentonit-Coombs-
Test. Diagnostik 6, 142 (1973)

- 12 BURCH, P.R.J., ROWELL, N.R.:
Systemic lupus erythematosus. Etiological
aspects. Amer.J.Med. 38, 793 (1966)
- 13 CASALS, S.P., FRIOU, G.J., TEAGUE, P.O.:
Specific nuclear reaction pattern of anti-
body to DNA in lupus erythematosus sera.
J. Lab. clin. Med. 62, 626 (1963)
- 14 CAZENAVE, P.L.A.; CHAUSIT, M.:
Du lupus. Ann.Malad.Peau Syph. 4, 113 (1952)
- 15 DEICHER, H.: Lupus erythematoses visceralis. Autoimmun-
erkrankungen Klinik und Therapie. F.K.
Schattauer Verlag, Stuttgart-New York
(1969) S. 199.
- 16 FREEDMAN, P.m MARKOWITZ, A.S.:
Gamma globulin and complement in the
diseased kidney. J.clin.Invest. 41, 328
(1962)
- 17 FRIOU, G.J. Antinuclear antibodies: diagnostic signi-
ficance and methods.
Arthr. Rheum. 10, 151 (1967)

- 18 GLYNN, L.E., HOLBOROW, E.J.:
Autoimmunity and disease. S. 108-131
Blackwell Scientific. Publ., Oxford 1965
- 19 GOODMAN, H.C.: Clin.Research 7, 264 (1959)
- 20 GOODMAN, H.C., FAHEY, J.L., MALMGREN, R.A., BRECHER, G.:
Separation of factors in lupus erythematosus
serum reacting with components of cell nuclei.
Lancet II, 277 (1959)
- 21 GRABAR, P., BURTIN, P.:
Immunoelktrophoretische Analyse.
Elsevier Verlag, Amsterdam-London-New York
1964
- 22 GROSS, L.: The heart in atypical verrucous endocarditis.
Aus LIBMAN-SACKS (Eds.): Contributions to
the medical sciences in honor of Dr. Emanuel
Libman by his pupils, friends and colleagues.
New York, The Internat. Press 527 (1932)
- 23 GROSS, L.: The cardiac lesions in Libman-Sacks disease
with consideration of its relationship to
acute diffuse lupus erythematosus.
Amer.J.Path. 16, 375 (1940)

- 24 GROSSMANN, L. MOLDAVE, K.:
Methods in Ezymology. Vol. XII. Nucleic
acids. Part A. S.418-420.
Academ. Press, New York, London 1967
- 25 HARGRAVES, M.M., RICHMOND, H., MORTON, R.:
Presentation of two bone marrow elements:
The "tart" cell and the "LE" cell.
Proc. Mayo Clin. 23, 25 (1948)
- 26 HASERICK, J.R., LEWIS, R.A., BORTZ, D.W.:
Blood factor in acute disseminated lupus
erythematosus. Determinations of gamma
globulins as specific plasma fraction.
Amer.J.Med.Sci. 219, 660 (1950)
- 27 HERMANN, G.:
Organantigene und Antikörperbildung bei
Autoimmunkrankheiten. Autoimmunerkrankungen
Klinik und Therapie. S.3-9.
F.K.Schattauer Verlag Stuttgart-New York 1969
- 28 HOLMAN, H.R.:
Partial purification and characterization of
an extractable nuclear antigen which reacts
with SLE sera.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 124, 800 (1965)

- 29 HOLMAN, H.R., DEICHER, H.R.G., KUNKEL, H.G.:
The LE cell and the LE serum factors.
Bull.N.Y.Acad.Med. 35, 409 (1959)
- 30 HOLMAN, H.R., KUNKEL, H.G.:
Affinity between the lupus erythematosus
serum factors and cell nuclei and nucleo-
protein. Science 126, 275 (1957)
- 31 HUMAIR, L.M.:
 $\text{S}_{1\text{C}}$ -globulin and complement in nephritis.
Helv.Med.Acta 34, 279 (1968)
- 32 KLEMPERER, P.:
The concept of collagen diseases.
Amer.J.Path. 26, 505 (1950)
- 33 KLEMPERER, P., GUEFT, B., LEE, S.L., LEUCHTENBERGER, C., POLLISTER,
K.W.: Cytochemical changes of acute lupus
erythematosus. Arch.Path. 49, 503 (1950)
- 34 KOFFER, D., KUNKEL, H.G.:
Mechanisms of renal injury in systemic
lupus erythematosus.
Amer.J.Med. 45, 165 (1968)
- 35 KOFFLER, D., SCHUR, P.H., KUNKEL, H.G.:
Immunological studies concerning the nephritis
of systemic lupus erythematosus.
J: exp. Med. 126, 607 (1967)

- 36 KOLMER, J.A., BOERNER, F.:

Approved Laboratory Technic. 4.Aufl.

- 37 KURLAND, L., HAUSER, W.A., FERGUSON, R.H., HOLLEY, K.E.:

Epidemiologic features of diffuse connective
tissue disorders in Rochester, Minn. 1951
through 1967, with special reference to
systemic lupus erythematosus.
Mayo Clin. Proc. 44, 649 (1969)

- 38 LACHMAN, P., KUNKEL, H.G.:

Correlations of antinuclear antibodies to
nuclear staining patterns.
Lancet II, 436 (1961)

- 39 LEVINE, L., SEAMAN, E., HAMMERSCHLAG, F., VAN VUNAKIS, H.:

Antibodies to photoproducts of deoxyribo-
nucleic acids irradiated with ultraviolet
light. Science 153, 3744 (1966)

- 40 LEWIS, R.M., HATHAWAY, J.E.:

J.Small Anim. Pract. 8, 273 (1967)

- 41 LIBMAN, E., SACKS, B.:

A hitherto undescribed form of valvular
and mural endocarditis.
Arch. Intern.Med. 33, 701 (1924)

- 42 McDUFFIE, F.: Haemobartonella and systemic lupus erythematosus.
Ann. intern. Med. 77, 470 (1972)
- 43 MIESCHER, P.A.: Serological reactions in systemic lupus erythematosus.
Arthr. Rheum. 6, 524 (1963)
- 44 MIESCHER, P., COOPER, N.S., BENACERRAF, B.:
Experimental production of antinuclear antibodies.
J. Immunol. 85, 26 (1961)
- 45 MIESCHER, P., FAUCONNET, M.:
L'absorption du facteur "LE" par des noyaux cellulaires isolés.
Experientia 10, 252 (1954)
- 46 MIESCHER, P.A., PARONETTO, F.:
Systemic lupus erythematosus.
Textbook of immunopathology. S.675-712.
Grunn and Stratton Publ. New York 1969
- 47 MORTEO, O.G., FRANKLIN, E.C., McEWANS, C., PHYTHYON, J., TANNER, M.:
Studies of relatives of patients with systemic lupus erythematosus.
Arthr. Rheum. 4, 356 (1961)

- 48 NAIRN, R.C.: Fluorescent protein tracing.
E.u.S.Livingstone Ltd. Edinburgh, London
Third Edit. 1969
- 49 OSLER, W.: On the visceral complications of erythema
exudativum multiforme.
Amer.J.Med.Sc. 110, 629 (1895)
- 50 OUCHTERLONY, O. Diffusion-in-gel methods for immunological
analysis.
Progr. Allergy, 5, 1-78 (1958)
- 51 PEARSON, C.M., CRADDOCK, C.G., SIMMONS, N.S.:
Complement fixation reaction with DNA and
leucocyte materials in SLE in correlation
with LE cell phenomenon and the clinical
status. J.Lab.clin.Med. 52, 580 (1958)
- 52 PHILLIPS, J.H., BRAUN, W., PLESCIA, O.J.:
J.Amer.Chem. Soc. 80, 2710 (1958)
- 53 PLESCIA, O.J., BRAUN, W., PALCZUK, N.C.:
Production of antibodies to denatured
deoxyribonucleic acid (DNA).
Proc.Nat.Acad.Sc. 52, 279 (1964)

- 54 PUTKONEN, T., JOKINEN, E.J., LASSUS, A., MUSTAKALLIS, K.K.
Chronic biologic false positive seroreactions
for syphilis as a harbinger of systemic
lupus erythematosus.
Derm.Venereol. 47, 83 (1967) (Stockh.)
- 55 ROBBINS, W.C., HOLMAN, H.R., DEICHER, H.R., KUNKEL, H.G.:
Complement fixation with cell nuclei and
DNA in lupus erythematosus.
Proc.Soc.exp.Biol.N.Y. 96, 575 (1957)
- 56 SCHUR, P.H., SANDSON, J.:
Immunologic factors and clinical activity
in systemic lupus erythematosus.
New Engl. J.Med. 278, 533 (1968)
- 57 SEEGAL, B.C., ACCINI, L., ANDRES, G.A., BEISER, S.M., CHRISTIAN,
C.L., ERLANGER, B.F., HSU, K.C.:
Immunologic studies of autoimmune disease
in NZB/NZW F₁ mice. I. Binding of fluorescein-
labeled antinucleoside antibodies in lesions
of lupus like nephritis.
J.exp. Med. 130, 203 (1969)
- 58 SELIGMAN, M.:
Etudes immunologiques sur le lupus érythéma-
teux disséminé.
Rev.Franc. Et.clin.Biol. 3, 558 (1958)

- 59 SELIGMAN, M., HANAU, C.:

Etude immunoelectrophoretique du sérum des
malades atteints de lupus érythémateux
disséminé.

Rev. hématol. 13, 239 (1958)

- 60 SELIGMAN, M., MILGROM, F.:

Mise en évidence par la fixation du complément
de la réaction entre acide desoxyribonucléique
et sérum de malades atteints de lupus
érythémateux disséminé.

Vox Sang. 2, 270 (1957)

- 61 STEFFEN, C.:

Allgemeine experimentelle Immunologie und
Immunpathologie.

G.Thieme Verlag, Stuttgart 1968

- 62 STOLLAR, D., LEVINE, L.:

Antibodies to denatured deoxyribonucleic
acid in a lupus erythematosus serum.

J. Immunol. 87, 477 (1961)

- 63 STOLLAR, D., LEVINE, L., MARMUR, J.:

Antibodies to denatured deoxyribonucleic
acid in lupus erythematosus serum.

II. Characterization of antibodies in
several sera.

Biochim.Biophys.Acta 61, 7 (1962)

- 64 STOLLAR, B.D., SANDBERG, L.A.:

Comparison of antibodies reacting with DNA.
Systemic lupus erythematosus sera and rabbit
antibodies induced by DNA-methylated bovine
serum albumin complexes.
J. Immunol. 96, 758 (1966)

- 65 STOMSKA-SCHMITT, J., DANIELEWICZ, H., TECKA, M., DUBROWSKA, D.:

Evaluation of the suitability of Latex
reagent (manufactured by Hyland) for the
detection of LE factor.
Rheumatologia 2/3, 251 (1964)

- 66 SVEC, K.H., BLAIR, I.D., KAPLAN, M.H.:

Immunopathological studies in systemic
lupus erythematosus (SLE). I. Tissue bound
immunoglobulins in relation to serum anti-
nuclear immunoglobulins on systemic lupus and
in chronic liver disease with LE cell factor.
J. Clin. Invest. 46, 558 (1967)

- 67 TAN, E.M., KUNKEL, H.G.:

Characteristic of a soluble nuclear antigen
precipitating with sera of patients with
systemic lupus erythematosus.
J. Immunol. 96, 467 (1966)

- 68 TAN, E.M., KUNKEL, H.G.:

An immunofluorescent study of the skin lesions
in systemic lupus erythematosus.

J. Immunol. 96, 464 (1966)

- 69 TAN, E.M., NATALI, P.G.:

Comparative study of antibodies to native
and denatured DNA.

J. Immunol. 104, 902 (1970)

- 70 TAN, E.M., SCHUR, P.H., CARR, R.I., KUNKEL, H.G.:

Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies
to DNA in the serum of patients with systemic
lupus erythematosus.

J. Clin. Invest. 45, 1732 (1966)

- 71 TOWENES, A.S., STEWART, C.R., OSLER, A.G.:

Immunological studies of systemic lupus
erythematosus I and II.

Bull. John Hopkins Hosp. 112, 183 (1963).

Herrn Prof. Dr.Dr. H. Eyer möchte ich für die Möglichkeit, eine Promotionsarbeit am Max von Pettenkofer-Institut zu übernehmen, danken. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Schierz für die Überlassung des Themas und vielerlei gewährte Unterstützung. Fräulein Dr. B. Farwick danke ich für wertvolle Diskussion bei theoretischen Problemen.

Weiterhin danke ich Frl. K. von Busch und Frau E.Petras für die Anleitung bei der Durchführung der praktischen Arbeiten.

An dieser Stelle möchte ich auch besonders Frau Dipl.-Biol. R. Paulig für die Durchsicht und Korrektur der sprachlichen Ausarbeitung danken.

Als Stipendiatin des DAAD danke ich diesem für die Möglichkeit, in Deutschland mein Studium fortsetzen zu können.

Lebenslauf

- 1941 am 12. Juli als Tochter des Regierungsbeamten Luang Sanpakpisute und seiner Ehefrau Vanee in Bangkok, Thailand geboren.
- 1959 Abitur an der Suksanaree Schule, Bangkok.
- 1959-1962 Studium der Naturwissenschaft an der Chulalongkorn-Universität, Bangkok.
- 1962 "Higher Certificate der Naturwissenschaft"
- 1962-1966 Studium der Medizin an der Mahidol-Universität, Bangkok.
- 1966 "Doctor of Medicine" (M.D.), Siriraj-Krankenhaus der Mahidol-Universität.
- 1967 Medizinalassistentin am Buddhachinaraj-Krankenhaus in Pittsanulok.
- 1968 "The Post-Graduate Diplom in Internal Medicine" im Siriraj-Krankenhaus der Mahidol-Universität, Bangkok, erworben.
- 1970 Wissenschaftliche Assistentin für Mikrobiologie, Siriraj-Krankenhaus der Mahidol-Universität, Bangkok.
- 1973 Forschungstätigkeit als DAAD-Stipendiatin am Max von Pettenkofer-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München.

